

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



PAPEL DA VITAMINA D NA SUSCEPTIBILIDADE PARA A DIABETES MELLITUS TIPO 1



Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Nuno Miguel Pimenta de Oliveira

Maio de 2010

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**PAPEL DA VITAMINA D NA SUSCEPTIBILIDADE
PARA A DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Por:

Nuno Miguel Pimenta de Oliveira

Orientado por:

Professor Doutor Manuel Carlos Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Manuel Carlos Lemos.



RESUMO

A diabetes mellitus tipo 1 é uma doença crónica auto-imune, caracterizada pela destruição selectiva das células β nos ilhéus pancreáticos, resultando numa perda lenta e progressiva da secreção de insulina e para a qual contribuem factores ambientais e factores de predisposição genética.

Vários estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que a vitamina D tem um efeito protector contra o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 1, através da modulação da resposta do sistema imunitário, assim como um efeito protector contra o desenvolvimento de vários tipos de cancros, outras doenças auto-imunes, doenças cardiovasculares ou mesmo da diabetes mellitus tipo 2.

O papel desta vitamina na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo é reconhecido há décadas. Porém, a recente descoberta da existência de receptores de vitamina D em vários tecidos, assim como a capacidade destes para transformar 25(OH)D no metabolito mais activo, 1,25(OH)₂D₃ parece guiar esta molécula para um futuro promissor.

Este trabalho visa discutir o efeito protector da vitamina D contra o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 1, salientando as consequências da deficiência de vitamina D e a contribuição da sua suplementação para a prevenção desta patologia, assim como identificar o efeito dos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e acção da vitamina D, sobre a susceptibilidade para a diabetes mellitus tipo 1, através de uma revisão e análise da literatura científica mais relevante, publicada até à data.



Palavras-chave: vitamina D, diabetes mellitus tipo 1, etiopatogenia, polimorfismos, imunomodulação, genética.



ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease, characterized by a selective destruction of β cells of the pancreatic islets, resulting in a slow and progressive loss of insulin secretion and for which environmental factors and genetic predisposition factors.

Several epidemiological and experimental studies suggest that vitamin D may have a protective effect against the development of type 1 diabetes mellitus, through a mechanism of modulation of the immune response, and also a protective effect against the development of several types of cancer, other immune-mediated diseases, cardiovascular diseases and even diabetes mellitus type 2.

The role of this vitamin in the maintenance of calcium and phosphorus homeostasis has been acknowledged for decades. However, the recent discover of vitamin D receptors in several tissues and their ability to convert 25(OH)D into the most active metabolite, 1,25(OH)₂D₃ appears to guide this molecule to a promising future.

This review aims to discuss the protective effect of vitamin D against the development of type 1 diabetes mellitus, focusing on the consequences of vitamin D deficiency, the contribution of its supplementation for the prevention of this pathology, the identification of the effect of polymorphisms in genes involved in the metabolism, and action of vitamin D on the susceptibility to type 1 diabetes mellitus, by means of a relevant scientific literature analysis and review, of the latest published research.



Keywords: vitamin D, type 1 diabetes mellitus, etiopathogenesis, polymorphisms, immunomodulation, genetics.



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional e suporte emocional ao longo de todo este percurso, sem eles não seria possível a concretização deste sonho.

À Anita, pelo carinho, cumplicidade, paciência e optimismo demonstrados em todos os momentos.

A todos os meus amigos que estiveram sempre presentes e que me permitiram ultrapassar todos os obstáculos.

Agradecimento especial, ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Lemos, por todo o apoio e empenho na elaboração deste trabalho, pela disponibilidade pessoal e transmissão de conhecimentos.



ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE QUADROS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1) Enquadramento do tema	1
1.2) Objectivos e Métodos	2
2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA – VITAMINA D	4
2.1) Metabolismo da vitamina D.....	6
2.2) Factores que influenciam a concentração plasmática de vitamina D	8
2.3) Deficiência e insuficiência de vitamina D	11
2.3.1) Consequências da deficiência de vitamina D, a nível esquelético ...	13
2.3.2) Consequências da deficiência de vitamina D, a nível não esquelético	15
2.4) Suplementação oral e toxicidade por vitamina D	17
3 – DESENVOLVIMENTO – VITAMINA D E DIABETES MELLITUS TIPO 1..	19
3.1) Patogenia da diabetes mellitus tipo 1	21
3.2) Factores ambientais na etiopatogenia da diabetes mellitus tipo 1.....	24
3.2.1) Latitude	26
3.2.2) Estação do ano	28



3.2.3) Deficiência de vitamina D como factor de risco para a diabetes mellitus tipo 1.....	29
3.2.3.1) <i>Estudos em modelos animais</i>	29
3.2.3.2) <i>Estudos em humanos</i>	30
3.2.4) Suplementação com vitamina D ou análogos da vitamina D na prevenção da diabetes mellitus tipo 1	32
3.2.4.1) <i>Estudos em modelos animais</i>	32
3.2.4.1) <i>Estudos em humanos</i>	33
3.3) Factores genéticos na etiopatogenia da diabetes mellitus tipo 1	36
3.3.1) Polimorfismo do receptor da vitamina D	38
3.3.2) Polimorfismo das enzimas metabolizadoras da vitamina D	44
3.3.3) Polimorfismo da proteína de ligação da vitamina D	47
3.4) Efeito imunomodelador da vitamina D	49
4 – CONCLUSÃO	53
5 – BIBLIOGRAFIA	55
6 – ANEXO – DECLARAÇÃO DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO	66



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Nomenclatura e estrutura química dos precursores e metabolitos da vitamina D	4
Figura 2 - Fotoprodução e metabolismo da vitamina D, na homeostase do cálcio e fósforo	7
Figura 3 - Mecanismo de acção da vitamina D a nível celular e regulação genética	8
Figura 4 - Patogenia da DM1	23
Figura 5 - Efeito imunomodelador da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	51



ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Factores que influenciam a concentração plasmática da vitamina D	9
Quadro 2 - Estudos de associação entre polimorfismos do gene <i>VDR</i> e a diabetes mellitus tipo 1	40
Quadro 3 - Estudos de associação entre os polimorfismos -1260 e +2838 do gene <i>CYP27B1</i> e a diabetes mellitus tipo 1	45
Quadro 4 - Estudos de associação entre os polimorfismos <i>HaeIII</i> , <i>StyI</i> e repetição <i>(TAAA)_n</i> do gene <i>DBP</i> e a diabetes mellitus tipo 1	48



LISTA DE ABREVIATURAS

APC: células apresentadoras de antígenos	HLA: antígenos de leucócitos humanos
ARNm: ácido desoxirribonucleico mensageiro	HPO₄²⁻: ião fosfato
BB: BioBreeding	IA-2: protein tyrosine phosphatase-like molecule
Ca²⁺: ião cálcio	ICA: islet cell antibody
CD: células dendríticas	IFN: interferão
Cβ: células β pancreáticas	IL: interleucina
DBP: proteína de ligação da vitamina D	kDa: kilodalton
DM1: diabetes mellitus tipo 1	L: litro
DM2: diabetes mellitus tipo 2	Mcf: macrófagos
EUA: Estados Unidos da América	MHC: complexo de histocompatibilidade major
FGF23: factor de crescimento de fibroblastos 23	mL: mililitro
GAD₆₅: glutamic acid decarboxylase	ng: nanograma
Gc: group-specific component	nm: nanometro
HbA1c: hemoglobina glicada	nmol: nanomole



NOD: non-obese diabetic

T-NK: células T natural killer

Pi: fósforo inorgânico

Treg: células T reguladoras

CD4+CD25+

PTH: hormona paratiroideia

RXR: retinoid X receptor

UI: unidades internacionais

SNP: polimorfismo de nucleotídeo
único

UVB: radiação ultravioleta B

VDR: receptor da vitamina D

Tcit: células T citotóxicas

VDRE: vitamin D responsive

element

Th: células T auxiliares

TNF: factor de necrose tumoral

μL: microlitro



1 – INTRODUÇÃO

1.1) Enquadramento do tema

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença crónica autoimune, caracterizada pela destruição selectiva das células β pancreáticas, resultando numa perda lenta e progressiva da secreção de insulina.¹ Esta doença representa cerca de 10% de todos os casos de diabetes, afectando cerca de 2 milhões de pessoas na Europa e América do Norte.²

Segundo um estudo da DIAMOND (Diabetes Mondiale)³ patrocinado pela Organização Mundial de Saúde, a incidência da DM1 varia amplamente entre países e inclusive dentro dos próprios países. Portugal possui uma incidência elevada, de aproximadamente 18 casos por 100.000 habitantes/ano.⁴ As razões para as variações observadas na incidência de DM1 é desconhecida, mas diferenças na dieta, estilo de vida e/ou genética podem estar envolvidos.⁴

A diabetes era considerada uma patologia incomum no século XIX e as taxas mantiveram-se relativamente baixas até meados da década de 50 do século XX.⁴ No entanto, hoje em dia verifica-se um aumento global na incidência de DM1 de 3% por ano e estima-se que a incidência desta no ano de 2010 seja 40% superior à verificada em 1998.⁵ A razão para este aumento na incidência permanece desconhecido, mas decorre de forma demasiado rápida para ser apenas explicado apenas por factores genéticos⁴, o que sugere um importante papel para factores ambientais na etiologia da DM1.⁶

Reconhece-se actualmente que, tanto factores genéticos como ambientais estão envolvidos, sendo que a deficiência de vitamina D surge



como um dos principais candidatos como factor ambiental.⁷ A sua deficiência parece estar envolvida na patogenia da DM1, possivelmente devido ao seu efeito modelador do sistema imunitário e ao seu envolvimento na regulação da diferenciação e proliferação celulares.⁸⁻¹⁰ O papel desta vitamina na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo é reconhecido há décadas.^{11,12} No entanto, a recente descoberta da existência de receptores de vitamina D em vários tecidos, assim como a capacidade destes para transformar 25(OH)D no metabolito mais activo, 1,25(OH)₂D₃ parece guiar esta “velha” molécula para um futuro promissor.^{10,13-15} Aliás, vários estudos demonstram a importância da vitamina D na prevenção de cancros, doenças auto-imunes, entre as quais se encontra a DM1, doenças cardiovasculares ou mesmo a diabetes mellitus tipo 2 (DM2).¹²

Como a DM1 é uma patologia que afecta sobretudo indivíduos jovens, muitos destes irão sofrer complicações diabéticas no futuro que reduzirão a sua qualidade de vida. Assim, a prevenção desta doença é extremamente importante.²

1.2) Objectivos e Métodos

Como principais objectivos do trabalho, destaco os seguintes:

- (a) Rever os mecanismos fisiologicos da vitamina D e os principais factores que influenciam a sua concentração plasmática;
- (b) Rever as principais consequências da deficiência de vitamina D e hipervitaminose;



(c) Recolher e analisar os estudos epidemiológicos e experimentais que relacionam a deficiência de vitamina D e a diabetes mellitus tipo 1, tanto em modelos animais como em humanos;

(d) Recolher e analisar os estudos epidemiológicos e experimentais que relacionam a suplementação com vitamina D ou análogos e a diabetes mellitus tipo 1, tanto em modelos animais como em humanos;

(e) Determinar o efeito dos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e acção da vitamina D, sobre a susceptibilidade para a diabetes mellitus tipo 1;

(f) Descrever o efeito protector da vitamina D contra o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 1, através da modulação da resposta do sistema imunitário.

Para a elaboração desta revisão bibliográfica, realizou-se uma pesquisa em vários motores de busca disponíveis na *internet*, como o PubMed (<http://www.pubmed.com>), o Google Académico (<http://scholar.google.pt/>) e a B-on (<http://www.b-on.pt>), utilizando como palavras-chave: “vitamin D”, “vitamin D deficiency”, “vitamin D supplementation”, “diabetes mellitus type 1”, “animal models”, “polymorphism”, “VDR”, “DBP” e “immune system”, assim como alguns livros da área.

Devido à natureza do trabalho, não foram colocadas restrições na data de pesquisa. Houve restrição de idiomas, tendo-se privilegiado artigos escritos em inglês, português e espanhol.

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA – VITAMINA D

As vitaminas são substâncias orgânicas essenciais para as reacções metabólicas nos seres vivos. Uma vez que não podem ser sintetizadas por via endógena, devem ser obtidas através da dieta. Entre estas, a vitamina D é uma excepção, uma vez que pode ser sintetizada na pele, quando exposta a radiação ultravioleta B (UVB). A designação “vitamina D” representa tanto a vitamina D₂ como a vitamina D₃.¹⁴

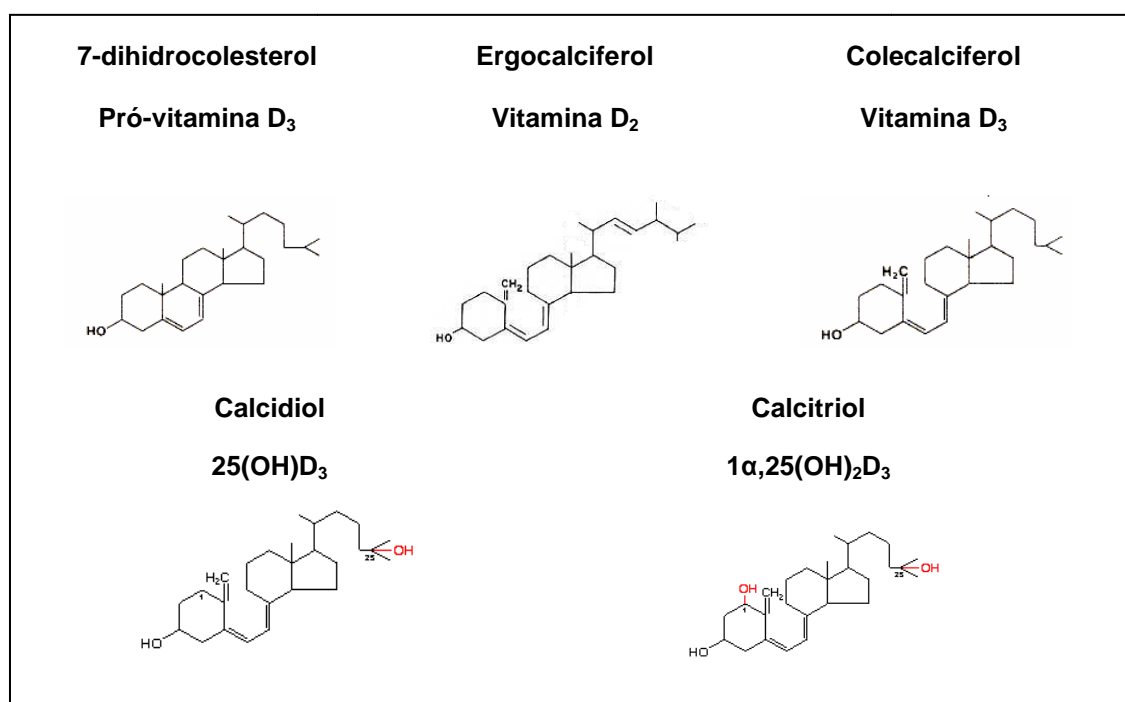


Figura 4: Nomenclatura e estrutura química dos precursores e metabolitos da vitamina D

A vitamina D₂ é uma molécula com 28 carbonos, produzida através da irradiação do ergosterol em plantas e fungos, enquanto a vitamina D₃ consiste numa molécula de 27 carbonos que pode ser encontrada, por exemplo, em peixes gordos ou óleo de fígado de bacalhau, sendo também produzida na pele.^{16,17} Quando comparadas entre si, a vitamina D₂ possui um grupo metil



extra no carbono 24 e uma ligação dupla entre os carbonos 22 e 23 (Figura 1). Apesar destas diferenças, ambas são metabolizadas pela mesma via, produzindo metabolitos activos com efeitos biológicos equivalentes.¹⁸ A vitamina D possui uma estrutura química que a torna susceptível a sofrer oxidação, alterações conformacionais induzidas pela radiação UVB e ataques por radicais livres.¹⁷

A exposição a radiação solar UVB é a principal fonte de vitamina D.¹⁶ Apesar desse facto, as vitaminas D₂ e D₃ também podem ser obtidas através da dieta. Porém, a sua distribuição nos alimentos naturais é muito pobre, sendo encontrada sobretudo em peixes gordos como salmão ou peixe-espada, gema de ovo, manteiga ou fígado.¹⁷ A dieta Ocidental fornece em média cerca de 10% da concentração plasmática de vitamina D, mas devido à sua fraca distribuição nos alimentos, alguns destes são enriquecidos com vitamina D.¹⁷ Nos EUA, alimentos como leite, sumo de laranja, pão, margarinas, cereais, queijos e iogurtes são enriquecidos. Por outro lado, e à excepção de países como a Suécia e Finlândia, a maioria dos países europeus continua a esquecer a fortificação alimentar.¹⁹ Esta vitamina D, encontrada tanto em alimentos como em suplementos vitamínicos é lipossolúvel, sendo facilmente absorvida no intestino delgado. Assim, tendo em consideração que as necessidades corporais são muito superiores ao que a dieta Ocidental tradicional consegue fornecer, apenas indivíduos que consomem grandes quantidades de peixe, baleia e foca conseguem manter uma ingestão adequada de vitamina D.¹⁷ A utilização de suplementos alimentares é particularmente útil durante a gravidez e lactação, para recém-nascidos e crianças, sobretudo de raça negra e a viver em países nórdicos.²⁰



2.1) Metabolismo da vitamina D

Como referido anteriormente, a vitamina D pode ser sintetizada na pele, quando exposta a radiação UVB, suprimindo desta forma a maioria das necessidades corporais.¹⁸

Durante a exposição solar, a radiação UVB quebra as ligações duplas entre os átomos de carbono 9 e 10 do 7-dihidrocolesterol, um precursor do colesterol¹⁹, que se encontra na membrana plasmática dos queratinócitos, sobretudo a nível da membrana basal da epiderme. Este processo resulta na abertura do anel B, com a formação da pré-vitamina D₃, que devido à sua instabilidade, é rapidamente convertida em vitamina D₃.^{16,19} Considera-se que esta é então difundida para a rede capilar da derme, onde se liga à proteína de ligação da vitamina D (DBP) para ser transportada até ao fígado.¹⁹

As vitaminas D₂ e D₃, provenientes da dieta, são absorvidas no intestino delgado¹¹, com uma eficiência de aproximadamente 60 a 90%.¹⁸ A interrupção deste processo, verificado em situações como a esteatorreia, pode levar a má absorção de vitamina D.¹⁸ Posteriormente, entram na corrente circulatória, onde juntamente com a vitamina D₃ produzida endogenamente, vão unir-se à DBP¹⁷ (Figura 2). As vitaminas D₂ e D₃ possuem pouca, ou nenhuma bioactividade intrínseca e reacções de hidroxilação sequenciais, a nível hepático e renal, sujeitas a mecanismos de controlo, sobretudo através da hormona paratiroideia (PTH) e iões cálcio e fósforo, são necessárias para a produção da forma biologicamente activa, 1 α ,25(OH)₂D₃. É a adição destes dois grupos hidroxilo que vai permitir a ligação com alta afinidade, da 1 α ,25(OH)₂D₃ ao receptor da vitamina D (VDR) nos tecidos alvo¹⁸ (Figura 3).

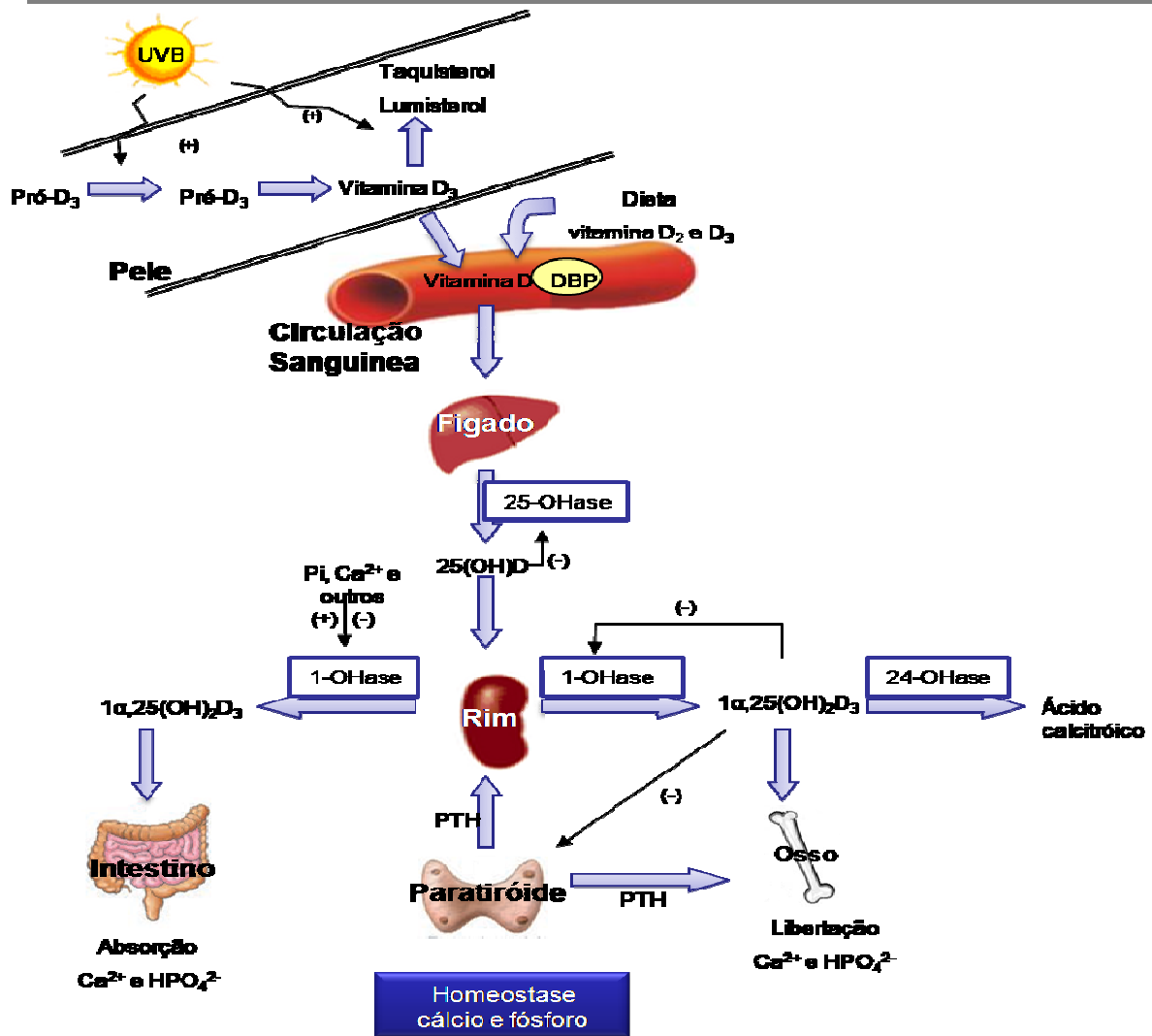
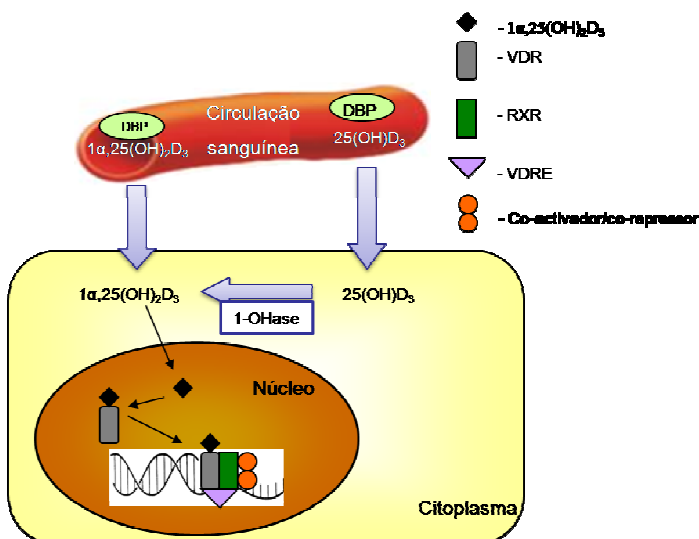


Figura 5: Fotoprodução e metabolismo da vitamina D, na homeostase do cálcio e fósforo.

Durante a exposição solar, a radiação UVB com um comprimento de onda 290-315 nm, que atinge a pele, converte o 7-dihidrocolesterol em pré-vitamina D, que é rapidamente convertida em vitamina D₃ por um mecanismo dependente de calor. Com a exposição excessiva à luz solar, a vitamina D₃ é degradada nos metabolitos biologicamente inactivos, lumisterol e taquisterol. Com a redução dos níveis de pré-vitamina D₃, o processo pode seguir o sentido contrário, sendo o lumisterol convertido em pré-vitamina D₃. As vitaminas D₂ e D₃ provenientes da dieta são incorporadas em quilomícrons, chegando à circulação sanguínea através do sistema linfático. Aqui, a vitamina D circula unida à DBP, sendo transportada até ao fígado, onde é convertida em 25-hidroxivitamina D, pela vitamina D-25-hidroxilase (25-OHase). Esta etapa é limitada pela concentração plasmática de 25(OH)D através de um mecanismo de feedback negativo. Após a sua formação no fígado, esta reentra na circulação, sendo transportada até ao rim, unida à DBP, onde é convertida na forma biologicamente activa, 1,25 dihidroxivitamina D₃, pela enzima 25-hidroxivitamina D₃-1 α hidroxilase (1-OHase), sobretudo no túbulo contornado proximal. O fósforo, cálcio ou factor de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), entre outros, podem estimular ou inibir a produção renal de 1,25 dihidroxivitamina D. Esta última, por seu lado, pode inibir a sua própria síntese através de um mecanismo de feedback sobre a 1-OHase, assim como inibir a síntese e secreção de PTH a nível da glândula paratiróide. A hormona PTH é o principal estímulo hormonal para a 1 α -hidroxilação, aumentando os níveis sistémicos de 1,25(OH)₂D₃. Uma outra enzima, a 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase (24-OHase) inicia a cascata catabólica da 25(OH)D e 1,25(OH)₂D₃, no metabolito hidrossolúvel e biologicamente inactivo, ácido calcitrólico, excretado na biles. A 1,25 dihidroxivitamina D estimula a absorção de cálcio e fósforo no intestino delgado, assim como a reabsorção de cálcio e fósforo a partir dos ossos, de forma a manter níveis plasmáticos adequados, essenciais para a mineralização óssea. Para além desta função, sobejamente conhecida, a vitamina D aparenta desempenhar funções imunomoduladoras, antiproliferativas e anti-inflamatórias, entre outras.

No entanto, apesar da última hidroxilação ocorrer sobretudo no rim, existem outros tecidos como a próstata, pulmões, placenta, paratiróide, cólon, células β pancreáticas, monócitos, macrófagos ou células dendríticas que possuem a enzima 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilase, que lhes confere a capacidade para produzir 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$.¹⁴ Estas fontes extra-renais parecem não contribuir significativamente para a concentração plasmática de 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$.

Figura 6: Mecanismo de acção da vitamina D a nível celular e regulação genética. A 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ e a 25(OH)D $_3$ que circulam na corrente sanguínea unidas à DBP são captadas nos tecidos alvo. A 25(OH)D $_3$ pode ser convertida na forma biologicamente activa, 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ pela enzima 1 α -OHase em fontes extra-renais. No núcleo, a 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ une-se ao VDR, um factor de transcrição activado por esta. Este complexo forma um heterodímero com o RXR (*retinoid X receptor*), o VDR-RXR, que posteriormente se vai unir ao VDRE (*vitamin D responsive element*) na região promotora de genes alvo, influenciando a taxa de transcrição mediada pela RNA-polimerase-II. Co-activadores e co-repressores transcricionais são recrutados, funcionando como uma ponte entre o complexo VDR-RXR e a maquinaria transcritcional, auxiliando na activação ou supressão de determinados genes. Vários co-activadores e co-repressores foram identificados como reguladores da transcrição genética induzida por VDR-RXR. Relativamente à sua relevância na diabetes, o VDRE é encontrado em genes que codificam proteínas que desempenham importantes funções nas células β pancreáticas, assim como no sistema imunitário, como são as citocinas e os factores de transcrição.



2.2) Factores que influenciam a concentração plasmática de vitamina D

Os factores físicos que atenuam a exposição a radiação UVB como o uso de roupa ou protector solar reduzem drasticamente a fotoprodução de vitamina D.¹⁶ A aplicação de protector solar com factor de protecção de 15 deve absorver 99% da incidência de fotões UVB, resultando numa diminuição de 99% na produção de pré-vitamina D $_3$.¹⁹ O grau de pigmentação da pele



também é um factor importante, pois indivíduos de raça negra, necessitam de cerca de 5-10 vezes maior exposição solar que indivíduos de raça branca para produzir a mesma quantidade de vitamina D ¹⁹, uma vez que o pigmento

Quadro 1: Factores que influenciam a concentração plasmática da vitamina D.

Redução da exposição solar
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indivíduos institucionalizados ▪ Viver em latitudes afastadas da linha do Equador ▪ Protector solar ou dispendir pouco tempo em actividades ao ar livre ▪ Roupas que reduzem a exposição solar
Nutrição/Absorção
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduzida ingestão de vitamina D ▪ Ressecção do intestino delgado ▪ Cirurgia gástrica ▪ Síndromes de má absorção ▪ Nutrição parenteral total ▪ Patologia hepática ▪ Crianças amamentadas com leite materno – possui quantidade reduzida de vitamina D
Síntese reduzida de vitamina D
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Idosos – fotoprodução de vitamina D menos eficiente ▪ Grau de pigmentação da pele ▪ Patologia hepática – redução da síntese de 25(OH)D₃ ▪ Patologia renal – redução da síntese de 1α,25(OH)₂D₃
Reduzida da biodisponibilidade
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Obesidade – vitamina D é armazenada nos adipocitos
Necessidades aumentadas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gravidez
Medicação
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anticonvulsivantes ▪ Rifampicina ▪ Corticoesteróides ▪ Colestiramina



melanina, quando presente em grandes quantidades, compete com o 7-dihidrocolesterol pela absorção da energia UVB, limitando desta forma a produção de vitamina D₃.¹⁸ Para além da diferença na pigmentação da pele, os seres humanos requerem diferentes graus de exposição para despoletar o processo endógeno de síntese de vitamina D na pele.¹⁷ Outros factores, como a latitude e estação do ano também poderão afectar o estado de vitamina D corporal^{17,19} (Quadro 1).

Durante a Primavera, Verão e Outono a radiação UVB que atinge o nosso planeta é suficiente para a fotoprodução de vitamina D. No entanto, à medida que o ângulo de zénite do sol se torna mais oblíquo com o aproximar do Inverno, o percurso dos fotões torna-se mais longo. Como resultado, o ozono absorve praticamente todos os fotões, impedindo-os de atingir a superfície da Terra^{16,19}, o que explica a variação na fotoprodução de vitamina D em diferentes latitudes e estações do ano.¹⁹ A latitudes acima dos 37° Norte e abaixo dos 37° Sul, a radiação solar é insuficiente para a produção cutânea de vitamina D nos meses de Inverno.^{16,20} Existe uma teoria que diz que a exposição solar da face e mãos durante 15 minutos, três vezes por semana, ou como alternativa, um total de 2 horas de exposição semanal^{17,20}, permitem a produção de vitamina D suficiente, para manter os níveis plasmáticos dentro dos limites de normalidade. No entanto, a menos que se habite a nível da linha do Equador, este é um pensamento enganador.¹⁷ O efeito da exposição solar na síntese corporal de vitamina D depende, entre outras coisas, da área corporal exposta e da estação do ano. Durante os meses de Inverno, em muitas partes do mundo, o ângulo do sol está tão alterado que a radiação UVB que atinge a pele está abaixo do limite necessário para a produção de vitamina



D. Neste sentido, latitude e estação do ano desempenham um papel importante.¹⁷

2.3) Deficiência e insuficiência de vitamina D

Actualmente existe consenso para que a concentração plasmática de vitamina D seja avaliada através da medição do metabolito da vitamina D, 25(OH)D, e não da medição da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a forma biologicamente activa.²² A 25(OH)D representa a principal forma circulante de vitamina D, possuindo uma meia vida de aproximadamente 21 dias. Por contraste, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possui uma meia vida de apenas 4-6 horas e uma concentração plasmática muito inferior.²³ A sua medição não se encontra adaptada para avaliar o estado de vitamina D. Em caso de insuficiência de vitamina D, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode estar diminuída, normal ou mesmo aumentada devido à sua acção sobre a PTH.²² Assim, a medição de 25(OH)D permite a classificação do estado da vitamina D corporal em deficiente, insuficiente ou suficiente.

Vários estudos concentraram-se na quantidade de vitamina D necessária para evitar a sua deficiência, manifestada por alterações ósseas como o raquitismo e osteopenia. Existe evidência, através da medição dos níveis de PTH e 25(OH)D plasmáticos, da existência de hiperparatiroidismo secundário quando os níveis de 25(OH)D se situam entre 15-20 ng/mL.²⁴⁻²⁶ Por outro lado, quando os níveis de 25(OH)D atingem cerca 32 ng/mL, a secreção de PTH é totalmente suprimida.²⁷ Também foi demonstrado que a absorção intestinal de cálcio se encontra reduzida em indivíduos com níveis circulatórios de 20 ng/mL quando comparados com indivíduos com níveis



superiores a 32 ng/mL.²⁸ Assim, tendo em consideração estes e outros resultados semelhantes, vários especialistas concordaram em definir a deficiência de vitamina D com níveis de 25(OH)D inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L). A insuficiência de vitamina D é reconhecida quando os níveis de 25(OH)D se mantêm entre 21-29 ng/mL, sendo considerada suficiente quando os níveis plasmáticos de 25(OH)D são superiores a 30 ng/mL (75 nmol/L).²³

Baseado nas novas definições de insuficiência e deficiência de vitamina D, estima-se que um bilião de pessoas em todo o mundo possua níveis plasmáticos de vitamina D insuficientes ou deficientes¹⁹, constituindo uma epidemia oculta, comum em muitas populações. Esta condição foi registada em todas as faixas etárias, porém, verifica-se sobretudo em afro-americanos, indivíduos de meia-idade e idosos, nos meses de Inverno.¹⁶

Vários estudos concluíram que a prevalência de deficiência de vitamina D nos EUA se situa em aproximadamente 36% em adultos jovens, 42% em mulheres negras entre os 15 e os 29 anos, 41% em pacientes em ambulatório entre os 49 e 83 anos e superior a 57% em pacientes internados.¹⁶ Taxas superiores são verificadas na Europa, onde 28-100% dos adultos saudáveis e 70-100% dos adultos hospitalizados apresentam algum grau de deficiência de vitamina D.¹⁶

Esta deficiência, segundo um estudo realizado nos EUA, é também encontrada em crianças, pois 48% das raparigas brancas, pré-adolescentes, possuíam níveis plasmáticos de 25(OH)D inferiores a 20 ng/mL no final do Inverno, sendo que no final do Verão, 17% destas ainda apresentava valores idênticos.¹⁹ Resultados semelhantes foram verificados na Arábia Saudita, Índia, Turquia, Nova Zelândia, Israel, Egito, Hong Kong, China, Líbia, Líbano,



Espanha e Austrália, onde 35-80% das crianças apresentavam deficiência de vitamina D.¹¹

Assim, indivíduos com uma exposição solar ou ingestão insuficiente de vitamina D, entre outras causas menos frequentes, possuem um risco superior de deficiência desta vitamina e consequentemente, de suportar as suas consequências a nível esquelético e não esquelético.²⁹

2.3.1) Consequências da deficiência de vitamina D, a nível esquelético

Uma deficiência crónica severa de vitamina D durante a infância pode causar deformação óssea devido a uma pobre mineralização dos ossos, patologia conhecida como raquitismo. Em adultos, podem desenvolver-se fraqueza muscular proximal, dor óssea e osteomalácia. Por outro lado, uma insuficiência menos severa de vitamina D, impede as crianças e adolescentes de atingirem o pico de massa óssea, geneticamente programado, enquanto em adultos, contribui para um hiperparatiroidismo secundário, aumenta o turnover ósseo e a perda progressiva de massa óssea, aumentando desta forma o risco de osteoporose.¹⁶

O nível óptimo de vitamina D plasmática é definido como um nível suficientemente alto para manter os níveis plasmáticos de cálcio e evitar o hiperparatiroidismo secundário. Uma insuficiência ou deficiência de vitamina D resulta numa diminuição da eficiência da absorção intestinal de cálcio, com consequente diminuição dos seus níveis plasmáticos. Esta diminuição é reconhecida por um receptor nas glândulas paratiróides, resultando num aumento da expressão, produção e secreção da PTH. Esta hormona é



responsável por estimular os rins na produção de maiores quantidades de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, assim como de aumentar a reabsorção tubular de cálcio e a excreção renal de fosfato, resultando em hipofosfatemia. Como consequência da hipofosfatemia, verifica-se uma redução do produto fosfato-cálcio, essencial para a mineralização da matriz óssea ¹⁹, com consequente redução da rigidez óssea. ¹⁶

O hiperparatireoidismo secundário é também responsável por um aumento no número e actividade dos osteoclastos, que reabsorvem o osso, através da degradação enzimática da matriz de colagénio e da secreção de ácido clorídrico, libertando desta forma cálcio e fósforo no espaço extracelular. Desta reacção resulta um aumento da porosidade, com deterioração da microarquitECTURA óssea, deficiente mineralização, diminuição da densidade mineral óssea e osteoporose, assim como um aumento do risco de fracturas. Assim, por um lado, a deficiência de vitamina D é responsável por uma pobre mineralização óssea, com raquitismo ou osteomalacia, enquanto por outro, aumenta o turnover e a reabsorção ósseas com consequente osteoporose. Ambos os mecanismos podem originar fracturas, sobretudo da anca. ³⁰

Vários estudos epidemiológicos revelaram que a prevalência de fracturas da anca é superior na América do Norte e Península da Escandinávia, enquanto o risco de fracturas é aproximadamente 7 vezes inferior nos países do sul da Europa quando comparados com os países do norte ¹⁴, localizados em latitudes superiores. Por sua vez, idosos que apresentaram deficientes níveis plasmáticos de vitamina D e que receberam suplementação com vitamina D, demonstraram um aumento do nível de $25(\text{OH})\text{D}$ plasmático,



diminuição do nível de PTH, assim como um aumento da densidade mineral óssea.³⁰

2.3.2) Consequências da deficiência de vitamina D, a nível não esquelético

Para além da sua importância na formação e metabolismo ósseos, a deficiência de vitamina D tem sido associada a uma ampla variedade de outras patologias, onde estão incluídos vários tipos de cancros, hipertensão, doenças auto imunes, como a DM1, a artrite reumatóide ou a esclerose múltipla, esquizofrenia e depressão.¹⁴

Em 1941 Apperly³¹ promoveu o conceito de que viver em latitudes elevadas aumentava o risco de mortalidade por cancro, quando comparado com latitudes inferiores. Desde esta observação inicial, numerosos estudos relacionaram a deficiência de vitamina D e viver em latitudes elevadas com o aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de cancro, como o cancro do cólon, próstata, esófago, ovário ou mama.^{19,22,29} A base para este efeito anti-tumoral existe, tendo em conta que, à semelhança de muitos outros tecidos, as células tumorais expressam o VDR, que quando activado possui a capacidade de induzir a diferenciação celular e apoptose e inibir a proliferação das células tumorais, a sua capacidade de invasão de tecidos, angiogénese e o potencial de metastizar, através da regulação da transcrição de genes alvo, como o P21 e P27.^{22,29} Por outro lado, a evidente capacidade de tecidos como a próstata, pulmões, cólon, células beta pancreáticas, monócitos, paratiróide ou mesmo células malignas para produzir $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ¹⁴ aponta para o seu papel parácrino e autócrino, que contribui para o potencial antiproliferativo.



O VDR também foi identificado no tecido muscular esquelético e são vários os estudos que relacionam a vitamina D com a condição e função musculares, sobretudo em idosos.¹³ Uma meta-análise concluiu que a suplementação com vitamina D reduziu em mais de 20% o risco de quedas em indivíduos idosos¹³, o que sugere que uma concentração plasmática adequada de 25(OH)D pode prevenir fracturas, através de uma melhoria da função musculo-esquelética para além do efeito sobre a homeostase do cálcio.

A nível do sistema cardiovascular, as implicações acerca do efeito da vitamina D, foram sugeridas por diferentes estudos epidemiológicos e apoiam-se no facto do VDR ser encontrado em muitas células do sistema cardiovascular.²² Baixos níveis de vitamina D foram associados a hipertensão arterial, calcificação das artérias coronárias, enfarte do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidentes vasculares cerebrais.²² Estudos em animais indicam que o calcitriol, através de um mecanismo dependente do VDR, possui a capacidade de diminuir a expressão genética da renina, uma enzima cujas acções afectam a homeostase da pressão arterial.¹³

Existe uma associação entre viver em latitudes elevadas e um risco aumentado de desenvolver doenças auto imunes como a esclerose múltipla, DM1, artrite reumatóide ou doença de Crohn. Por outro lado, mulheres que ingeriram mais de 400 UI de vitamina D/dia (1 UI = 0,025 µg) obtiveram uma redução de 42% no risco de desenvolver esclerose múltipla e de 41% no risco de desenvolver artrite reumatóide.¹⁹ São vários os estudos que sugerem que a suplementação com vitamina D na infância reduz o risco de DM1, o que está de acordo com o seu potencial modelador do sistema imunitário.²⁹



A deficiência de vitamina D tem sido também associada à diminuição da tolerância à glicose e à DM2 em humanos. Estas observações foram confirmadas por modelos animais, que demonstraram que a secreção pancreática de insulina pode ser inibida pela deficiência de vitamina D.¹⁵ Após uma injeção de vitamina D, a tolerância à glicose e a secreção de insulina aumentam consideravelmente.³² Por outro lado, a capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora da vitamina D podem reduzir a resistência à insulina, característica da DM2.³² Outros estudos também encontraram uma associação entre baixos níveis de vitamina D e a DM2. Nestes casos, a reposição de vitamina D para níveis plasmáticos suficientes, provocou uma melhoria na secreção de insulina e na tolerância à glicose, assim como nos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c).³²

2.4) Suplementação oral e toxicidade por vitamina D

Existe alguma preocupação de que o aumento das necessidades de ingestão de vitamina D aumente o risco de intoxicação em crianças e adultos. No entanto, deve ser referido que a intoxicação por vitamina D é extremamente rara, sendo maioritariamente provocada por uma ingestão excessiva, de altas doses de suplementos que contêm vitamina D.¹⁹ É muito improvável que a concentração plasmática de 25(OH)D atinja níveis tóxicos, apenas através da fotoprodução ou da ingestão de alimentos naturais, uma vez que a sua produção é altamente regulada.¹⁴ Porém, a dificuldade está em estabelecer a margem de segurança entre os níveis necessários para observar sinais clínicos de intoxicação e os níveis necessários para manter os níveis plasmáticos de



25(OH)D acima de 30 ng/mL. Os níveis tóxicos de 25(OH)D nunca foram claros, mas os casos de intoxicação surgiram sempre com níveis muito superiores a 100 ng/mL.²²

Um estudo registou que, homens adultos que receberam 10.000 UI de vitamina D₃/dia, por mais de 5 meses não demonstraram sinais de toxicidade.³³ A maioria dos estudos sugere que a intoxicação apenas ocorre quando doses superiores a 10.000 UI de vitamina D₂ ou D₃/dia são administradas durante vários meses a anos, correspondendo a níveis plasmáticos de 25(OH)D >150 ng/mL.¹⁹

Os relatos de toxicidade provocada pela vitamina D existem desde tão cedo como 1920.¹⁷ Indivíduos que recebiam milhares de UI de vitamina D descreviam sintomas como: anorexia, náuseas, vômitos, fraqueza muscular, fadiga, poliúria, polidipsia e nictúria. Os parâmetros laboratoriais demonstravam hipercalcemia, insuficiência renal aguda e crónica e vários graus de hiperfosfatemia. Foram também observadas calcificação excessiva das epífises e metáfises, nefrocalcinose e distúrbios cardiovasculares.¹⁷

Actualmente as recomendações são de 200 UI/dia para recém-nascidos, crianças e adultos até aos 50 anos de idade, 400 UI/dia para indivíduos entre os 51-70 anos e 600 UI para indivíduos com idade superior a 70 anos, com um nível tolerável de até 2000 UI diárias.²² Porém, alguns autores consideram estas recomendações desadequadas e potencialmente prejudiciais, e que as necessidades diárias de vitamina D provavelmente serão superiores a 2000 UI em adultos.²²



3 – DESENVOLVIMENTO - VITAMINA D E DIABETES MELLITUS TIPO 1

A DM1 é uma doença crónica auto-imune, caracterizada pela destruição selectiva das células β pancreáticas, resultando numa perda lenta e progressiva da secreção de insulina.¹ Esta patologia representa cerca de 10% de todos os casos de diabetes e afecta cerca de 2 milhões de pessoas na Europa e América do Norte.²

As taxas de incidência da DM1 variam com a idade, afectando sobretudo crianças jovens até aos 14 anos de idade.⁴ Raramente ocorre antes dos 6 meses de idade, aumenta acentuadamente a partir dos 9 meses até aos 12 a 14 anos, decrescendo a partir desta idade.⁶ Ao contrário de outras doenças auto-imunes, a incidência da DM1 parece ser relativamente superior no sexo masculino, particularmente entre os 25 e os 29 anos de idade.⁴ Apesar de ocorrer em todos os grupos raciais e étnicos⁶, verifica-se um risco superior na raça caucasiana e em indivíduos descendentes de europeus.^{2,3}

Existe também uma marcada variação geográfica na incidência da DM1, com as crianças na Finlândia a possuírem uma probabilidade 400 vezes superior de desenvolver esta patologia, quando comparadas com crianças Venezuelanas.² Segundo um estudo da DIAMOND (Diabetes Mondiale)³ patrocinado pela Organização Mundial de Saúde, a incidência da DM1 varia amplamente entre países e inclusive dentro dos próprios países. A Ásia, África e América Central e do Sul são continentes que apresentam taxas de incidência relativamente baixas de DM1, enquanto o norte da Europa, América do Norte, Nova Zelândia e Austrália apresentam as taxas mais elevadas.



Portugal também possui uma incidência elevada, de aproximadamente 18 casos por 100.000 habitantes/ano.⁴ As razões para as variações observadas na incidência de DM1 são desconhecidas, mas diferenças na dieta, estilo de vida ou genética podem estar envolvidas.⁴

A diabetes era considerada uma patologia incomum no século XIX e as taxas mantiveram-se relativamente baixas até meados da década de 50 do século XX.⁴ No entanto, actualmente verifica-se um aumento global na incidência de DM1 de aproximadamente 3% por ano, estimando-se que a incidência desta no ano de 2010 seja 40% superior à verificada em 1998.⁵ A justificação para este aumento na incidência da DM1 permanece desconhecida, porém, o aumento é demasiado acentuado para ser explicado apenas por factores genéticos⁴, o que sugere um importante papel para os factores ambientais na etiologia da DM1.⁶

Como esta patologia afecta sobretudo indivíduos jovens, muitos destes irão sofrer complicações diabéticas no futuro, que reduzirão a sua qualidade de vida. Assim, a prevenção desta doença é extremamente importante. Sabe-se actualmente que tanto factores genéticos, como ambientais estão envolvidos, sendo que a deficiência de vitamina D surge como um dos principais candidatos.² A ascensão em paralelo da incidência tanto da DM1 como da deficiência de vitamina D ergue a possibilidade da vitamina D desempenhar um papel na patogenia da DM1.³⁴



3.1) Patogenia da diabetes mellitus tipo 1

A DM1 caracteriza-se por uma destruição autoimune das células β pancreáticas, produtoras de insulina, por células T CD4+ e CD8+ e macrófagos e pela infiltração celular dos ilhéus pancreáticos – insulinite.² Este é um processo de destruição crónico, que muitas vezes tem início na infância e continua durante alguns meses a anos, resultando num pico de incidência da DM1, no início da adolescência. Na altura em que esta patologia se torna sintomática e é diagnosticada, cerca de 80-90% das células β já foram destruídas.^{35,36}

Foram observados infiltrados de células mononucleares, como linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B e macrófagos, nos ilhéus pancreáticos, em biópsias de indivíduos com DM1³⁶, assim como em necrópsias³⁷, o que indica que, tanto o sistema imunitário inato, como o sistema imunitário adaptativo, estão envolvidos no processo pró-inflamatório que leva à destruição das células β pancreáticas.⁴

A activação do sistema imunitário mediado por células T em indivíduos geneticamente susceptíveis leva a uma infiltração linfocitária dos ilhéus (insulinite), assim como uma resposta humoral através de células B, com a produção de autoanticorpos contra um ou mais autoantígenos.³⁶ Muito antes do desenvolvimento da diabetes, estes autoanticorpos contra as células β (ICA - islet cell antibody) e os seus antígenos já são detectáveis³⁵ e alguns indivíduos revelam mesmo a sua presença décadas antes do desenvolvimento da doença.⁴ A GAD₆₅ (glutamic acid decarboxylase), IA-2 (protein tyrosine phosphatase-like molecule) e insulina foram os 3 principais autoantígenos



identificados e cerca de 90% dos indivíduos com DM1, recentemente diagnosticados, possui anticorpos contra pelo menos um destes três autoantígenos.² A detecção de pelo menos um autoanticorpo fornece evidência de que um processo autoimune está a decorrer e é relevante para o diagnóstico. Porém, a inexistência de autoanticorpos não exclui completamente a presença de DM1.³⁶ Até à data, a expressão de múltiplos autoanticorpos é o melhor preditor de risco elevado de desenvolvimento de DM1. Entre os autoanticorpos anti-insulina, anti-GAD₆₅ e anti-IA-2, a expressão de apenas um destes, está associado a um risco aproximado de desenvolvimento de DM1 de 20% em 10 anos de seguimento.³⁶ Por outro lado, a expressão de 3-4 autoanticorpos está associado a um risco 60-100% de desenvolvimento da doença nos próximos 10 anos.¹

A patogenia da DM1 foi extensamente estudada, no entanto, o mecanismo exacto que desencadeia e permite a progressão para a destruição das células β permanece desconhecido. A apresentação de autoantígenos específicos das células β pelas células apresentadoras de antígenos (APC) – macrófagos, células B e células dendríticas – a células T auxiliares CD4+ (Th0) em associação com moléculas MHC de classe II, é considerado o processo inicial da doença^{35,36} (Figura 4). Os macrófagos e as células dendríticas secretam a interleucina 12 (IL-12) que promove a diferenciação das células Th0 em células Th1, estimulando-as a secretar o interferão γ (IFN- γ) e a IL-2. O IFN- γ , por sua vez, estimula os macrófagos em repouso a libertar outras citocinas como IL-1 β , factor de necrose tumoral α (TNF- α) e radicais livres, tóxicos para as células β pancreáticas. Durante este processo, as citocinas IFN- γ e IL-2 também induzem a migração das células T citotóxicas CD8+,

específicas contra os autoantígenos das células β . Estas, ao reconhecerem os autoantígenos específicos e em associação com moléculas de classe I, provocam a destruição das células β , através de apoptose mediada por Fas e da libertação de perforina e granzima.^{35,36} Citocinas como a IL-1, IFN- γ e TNF- α vão exacerbar a destruição celular através da estimulação do mecanismo mediado por Fas.³⁶

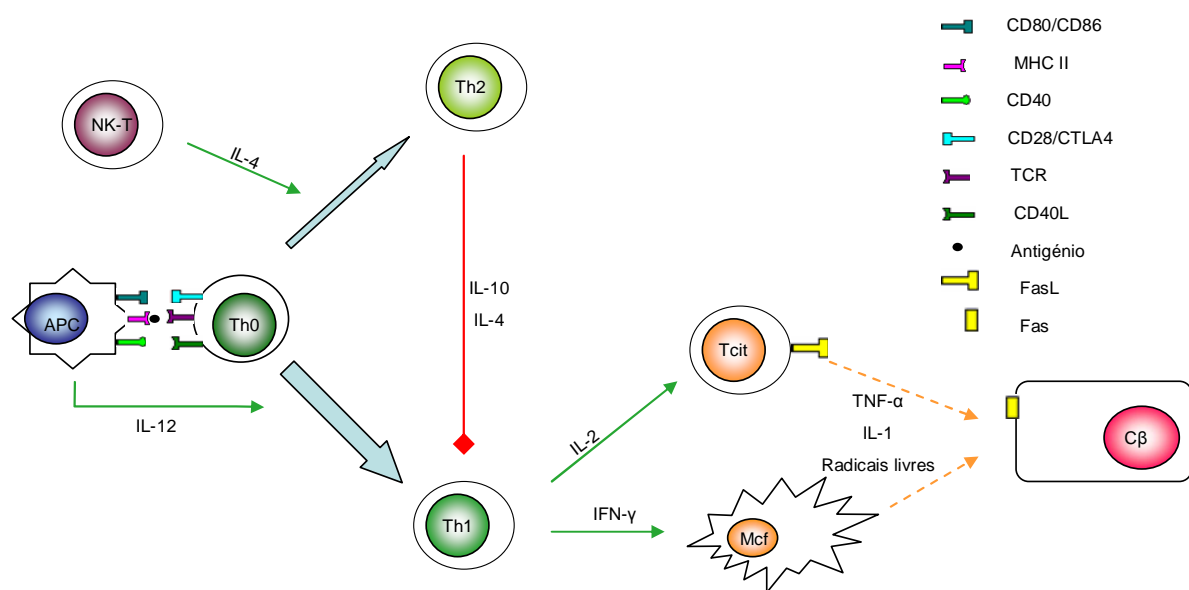


Figura 4: Patogénia da DM1. Antígenos das células dos ilhéus pancreáticos são apresentados a células naïve Th0, por células apresentadoras de antígenos (como as células dendríticas), em associação com moléculas MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras. Estas células apresentadoras de antígenos secretam a citocina IL-12, que promove a diferenciação em células com fenotipo Th1. O padrão de células Th1 secreta as citocinas IL-2 e IFN- γ , responsáveis pela indução de células T citotóxicas e macrófagos activados. Através da libertação de radicais livres, TNF- α e IL-1 e de um mecanismo mediado por Fas, estas células são responsáveis pela apoptose das células β pancreáticas e eventualmente pela DM1. Por outro lado, as células T-NK podem impedir a destruição das células β pancreáticas, através da secreção de IL-4, favorecendo a diferenciação das células Th0 em Th2. Este padrão de células Th2 liberta as citocinas IL-4 e IL-10 e inibe a secreção das citocinas IL-2 e IFN- γ pelas células Th1. APC, células apresentadoras de antígenos; Th, células T auxiliares; Tcit, células T citotóxicas; Mcf, macrófagos; T-NK, células T natural killer; C β , células β pancreáticas; setas verdes, estimulação; setas vermelhas, inibição; setas laranjas, citotoxicidade.

Por outro lado, as células T-NK podem prevenir a destruição das células β pancreáticas, através da secreção de IL-4 durante a diferenciação das



células Th0, favorecendo uma resposta benigna do tipo Th2 e inibindo as células Th1. Assim, as citocinas IL-4 e IL-10 secretadas pela célula Th2 CD4+ e a diminuição de IL-2 e IFN- γ previnem a destruição das células β e consequentemente a DM1.³⁵

Apesar de alguma controvérsia, a maioria dos estudos em humanos e animais, sugere o envolvimento directo das células T CD4+ (Th1) no ataque auto-imune, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de células T CD8+ citotóxicas. Por outro lado, a secreção de citocinas anti-inflamatórias pelas células Th2, confere protecção contra esta doença.³⁸ Além disso, actualmente existe evidência de associação entre o padrão Th17, a linhagem de células T CD4+ efectoras, recentemente descobertas e que é distinta de Th1 e Th2, com a patogénese da DM1.³⁶

3.2) Factores ambientais na etiopatogenia da diabetes mellitus tipo 1

Um grande número de factores ambientais tem sido investigado como possível responsável pelo despoletar da resposta autoimune contra as células β pancreáticas, tais como infecções virais (e.g. enterovírus, rotavírus e rubéola), dieta na primeira infância (e.g. amamentação vs introdução precoce de componentes do leite de vaca), toxinas (derivados N-nitroso) e deficiência de vitamina D.^{37,39}

No entanto, a identificação de tais factores ambientais tem-se mostrado bastante difícil.² Os vírus são os mais populares entre os candidatos, sendo os enterovírus, rotavírus e rubéola os principais suspeitos. De entre estes, até ao momento, a rubéola apresenta a mais forte associação, uma vez que as



crianças infectadas com síndrome da rubéola congénita possuem um risco aumentado de desenvolvimento da DM1. No entanto, a Finlândia, onde a vacinação erradicou eficazmente a rubéola, continua a apresentar a incidência mais alta de DM1.² As análises serológicas e de genética molecular, demonstraram que o vírus coxsackie B é encontrado com maior frequência em pacientes com DM1, que em indivíduos saudáveis. No entanto, a associação entre vírus e a DM1 continua controversa.⁴

Por outro lado, a documentação de maior incidência de DM1 nos países industrializados e com melhor qualidade de vida, relativamente aos países com menor qualidade de vida, levou à criação da “hipótese da higiene”. Segundo esta hipótese, a redução da exposição a infecções durante a infância resulta em menor protecção contra agentes infecciosos e consequentemente, é uma das causas do aumento da incidência de atopia e DM1 nos países desenvolvidos. Esta hipótese é suportada por estudos retrospectivos que analisaram o número de infecções em indivíduos saudáveis e indivíduos com DM1, antes do início da doença.^{2,4}

Também foi sugerido que a amamentação possa ter um efeito protector contra a DM1. Neste caso, os possíveis mecanismos de acção envolvidos incluem a protecção contra vírus concedida pelo leite materno, devido à presença de imunoglobulinas, um aumento da capacidade de resposta imunitária da criança, assim como o atraso na exposição a outros antigénios alimentares.¹ Por contraste, a ingestão precoce de proteínas do leite de vaca, e sobretudo da β caseína, foi considerado um factor de risco para o desenvolvimento de DM1 em pacientes de alto risco genético. Esta proteína é estruturalmente diferente da forma humana. Porém, a sua sequência é



homóloga a alguns autoantígenos das células β pancreáticas. Além disso, uma resposta imune contra a β -caseína já foi demonstrada, em pacientes com DM1 recém diagnosticada.³⁹

Em crianças, existe evidência epidemiológica que a ingestão de grandes quantidades de nitritos e compostos similares aumentam o risco de DM1⁶, enquanto em modelos animais, vários destes compostos, como a estreptozotocina, possuem efeitos tóxicos bem conhecidos para as células β .¹

A deficiência da vitamina D, por seu lado, parece desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da autoimunidade contra as células β pancreáticas. Esta actua como agente imunossupressor, através da redução da proliferação de linfócitos e produção de citocinas. A suplementação com vitamina D no início da infância está associada a uma diminuição da prevalência de DM1 em humanos e em modelos animais.³⁹

Existem razões para acreditar que factores de risco ambientais como estes possam actuar em fases precoces da vida e possivelmente *in utero*.⁴⁰

3.2.1) Latitude

A latitude e incidência de DM1 têm sido relacionadas através de diversos estudos epidemiológicos. Uma análise à incidência da DM1 na infância em 15 países, realizada em 1988, revelou que o gradiente de latitude explica 40% da variação do risco para a DM1.^{41,42} Na Europa, América do Norte e Sul, China e Austrália, a incidência de DM1 aumenta em latitudes superiores.^{42,43} Na Europa, a Finlândia possui uma incidência bastante elevada de cerca de 40,9 casos por 100.000 habitantes/ano, enquanto, por exemplo, a Letónia, Suíça ou



Bélgica possuem taxas de incidência consideravelmente inferiores, de aproximadamente 12 casos por 100.000 habitantes/ano. Os EUA e Canadá possuem altas taxas de incidência, 16 e 23 casos por 100.000 habitantes/ano, respectivamente, similar ao verificado no norte da Europa e que contrastam com as baixas taxas verificadas no Perú, Paraguai e República Dominicana na América do Sul.⁴

Um dos possíveis mecanismos para a explicação deste gradiente envolve a vitamina D, induzida pela radiação solar.⁴³ O gradiente Sul-Norte de incidência da DM1 segue o padrão inverso da distribuição global de radiação UVB solar. A incidência de DM1 é maior em regiões mais distantes da linha do Equador, onde a quantidade de radiação UVB é menor, enquanto a incidência de DM1 é menor em regiões mais próximas desta linha, onde a quantidade de radiação UVB é superior.⁴⁴

Assim, o papel protector proposto para a radiação UVB na DM1, pode residir na sua preponderância para a síntese de vitamina D na pele, tendo em consideração que cerca de 90% da vitamina D plasmática é produzida endogenamente.⁴³

Porém, existem excepções a este gradiente, como é o caso da Sardenha, que também possui uma taxa de incidência elevada, consideravelmente superior a outras regiões de Itália⁴ e da Noruega, cujas regiões mais a norte registam menor incidência, enquanto as regiões mais a sul apresentam maior incidência de DM1.⁴²



3.2.2) Estação do ano

Tem sido observada uma relação sazonal, entre o nascimento e o desenvolvimento da DM1, em vários países, como a Ucrânia, Israel, Nova Zelândia ou Holanda, onde as datas de nascimento dos indivíduos com a doença tendem a acumular-se nos meses de Primavera e Verão. Estes dados apontam para a possível influência da exposição solar na gravidez ou em fases importantes do desenvolvimento da criança. No entanto, esta relação não foi encontrada em alguns estudos e não é considerada um achado consistente.^{41,42}

Diversos estudos epidemiológicos descreveram também padrões sazonais, em casos de DM1 recentemente diagnosticada, em crianças. A maioria dos estudos reflectiu uma maior incidência de DM1 nos meses de Outono e Inverno e mais baixa incidência nos meses de Primavera e Verão, em ambos os hemisférios.⁴⁵ Este padrão tem sido identificado tanto no sexo masculino como feminino, em todas as idades, e parece ser mais proeminente em países com amplas diferenças de temperatura entre os meses de Verão e de Inverno.⁴

A variação sazonal foi considerada uma evidência indirecta da influência da exposição ambiental no desenvolvimento de DM1.^{4,45} Este padrão relaciona a menor incidência de DM1 com as maiores médias diárias de temperatura e horas de sol⁴, que possuem uma forte relação com a vitamina D plasmática.

No entanto, nestes estudos é difícil controlar os factores de confundimento socioculturais, como a crescente tendência das crianças para participar em actividades sedentárias no domicílio ou o uso de protectores



solares,⁴ assim como outros factores possivelmente envolvidos na etiologia da DM1 e que também podem variar com a latitude e as estações do ano, como são os casos das infecções ou dieta.⁴¹

3.2.3) Deficiência de vitamina D como factor de risco para a DM1

3.2.3.1) *Estudos em modelos animais*

O modelo de ratinhos NOD (*non-obese diabetic*) é um modelo animal, geneticamente susceptível à DM1.⁴⁶ Não reproduz perfeitamente a doença humana, porém, fornece lições importantes e conhecimentos sobre a possível heterogeneidade subjacente à complexa patogenia da DM1 humana.⁴⁷

Em ratinhos NOD, a deficiência de vitamina D *in utero* e no início da vida foi considerado como um factor de risco para o desenvolvimento de DM1. Um ambiente livre de fontes de vitamina D, tanto para os progenitores como para as ninhadas de ratinhos NOD, deu origem a ratinhos com deficiência desta vitamina. Esta deficiência levou a uma maior incidência de DM1, uma apresentação mais agressiva, assim como um início mais precoce da doença, relativamente a ratinhos com vitamina D suficiente.^{46,48} Também foi observado um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias nos ilhéus pancreáticos, assim como uma diminuição de linfócitos CD4+CD62L+, considerados como células reguladoras, no timo e nódulos linfáticos, nos ratinhos com deficiência de vitamina D.⁴⁸

A deficiência de vitamina D é assim considerada um factor ambiental que pode influenciar a expressão da DM1 em ratinhos NOD.^{46,48}



3.2.3.2) Estudos em humanos

Vários estudos sugerem uma associação entre a concentração de vitamina D plasmática e a DM1. Crianças e adolescentes australianos, com DM1, possuem níveis inferiores de 25(OH)D, quando comparados com o grupo de controlos, assim como uma probabilidade três vezes superior de sofrer de deficiência de vitamina D.³⁴ Resultados semelhantes foram encontrados no Qatar, EUA e Alemanha.⁴⁹⁻⁵¹ Em contraste, outros estudos não encontraram evidência de tal associação.^{52,53} Porém, nenhum dos estudos de associação acima citados apresentou dados acerca da medição da concentração de vitamina D plasmática, antes do diagnóstico da doença. Como tal, não permitem verificar o efeito da deficiência de vitamina D no desenvolvimento da DM1. Para melhor clarificação, seriam necessários estudos prospectivos.

Alguns estudos recentes evidenciaram uma associação entre baixos níveis plasmáticos de vitamina D e o risco de desenvolvimento de DM1.³⁴ Num estudo realizado na Suécia, Littorin *et al*⁵⁴ realizaram medições dos níveis plasmáticos de 25(OH)D em adultos jovens na altura do diagnóstico de DM1. Os resultados indicaram que a concentração de 25(OH)D era inferior nos indivíduos diabéticos, quando comparada com os controlos, sendo que 54% dos casos possuíam níveis de 25(OH)D inferiores a 80 nmol/L. Segundo os autores, estes níveis baixos de 25(OH)D devem ter contribuído para o desenvolvimento da DM1. No entanto, no seguimento, 8 anos após o diagnóstico, os níveis de 25(OH)D mantiveram-se baixos, o que sugere que a própria DM1 pode também ela estar na origem de uma diminuição dos níveis de vitamina D. Resultados semelhantes foram encontrados na Itália, por Pozzilli



*et al*⁵⁵, onde os níveis de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D₃ em indivíduos diabéticos, na altura do diagnóstico, eram consideravelmente inferiores aos níveis encontrados num grupo de controlos, independentemente do género, idade ou influência sazonal na altura do diagnóstico, assim como por Baumgartl *et al*⁵⁶, mas neste caso tais diferenças verificaram-se sobretudo no Verão. Nestes estudos, níveis mais baixos, tanto de 25(OH)D como de 1,25(OH)₂D₃, encontrados na altura do diagnóstico, suportam a ideia de que a deficiência de vitamina D pode ser um factor importante no aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento da DM1⁵⁴, possivelmente devido ao seu potente efeito modelador do sistema imunitário, com o seu envolvimento na regulação da diferenciação e proliferação celular. Durante a interpretação dos níveis de vitamina D em pacientes com DM1 recentemente diagnosticada, alguma atenção deve ser dada à cetoacidose diabética, uma vez que pode estar na origem de alterações do estado de vitamina D corporal.⁵⁷

Foram encontrados resultados que contradizem esta associação, por Bierschenk *et al*⁵², num estudo realizado na Florida, EUA, onde níveis reduzidos de 25(OH)D, na altura do diagnóstico, não estavam especificamente associados à DM1, uma vez que estes níveis se encontravam reduzidos tanto em indivíduos com DM1 recentemente diagnosticada, como em controlos, familiares em 1º grau, ou indivíduos com DM1 já estabelecida.

No entanto, em nenhum dos estudos acima mencionados foram efectuadas medições dos níveis de 25(OH)D ou 1,25(OH)₂D₃ antes do diagnóstico da DM1.



3.2.4) Suplementação com vitamina D ou análogos da vitamina D na prevenção da diabetes mellitus tipo 1

3.2.4.1) Estudos em modelos animais

Em ratinhos NOD, observou-se que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reduz a incidência de insulinite ^{47,58} e previne o desenvolvimento de DM1 ^{46,47,59}, com indução de células Treg CD4+CD25+ com actividade imunossupressora ⁵⁹, mas apenas quando a administração se inicia antes do desenvolvimento de insulinite, que ocorre cerca das 3 semanas de idade. Por seu lado, um análogo da vitamina D, KH1060, num estudo conduzido por Mathieu *et al* ⁶⁰, também demonstrou a capacidade de prevenir a DM1 em ratinhos NOD, em doses não hipercalcémicas e não desmineralizantes, mesmo após as 3 semanas de idade.

Em contraste, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi ineficaz na prevenção da progressão da diabetes em NOD quando dada a partir das 8 semanas de idade ⁶¹, quando os ratinhos já apresentavam insulinite bem desenvolvida. Porém, um tratamento combinado entre o análogo da vitamina D, MC1288 e a ciclosporina A ⁶², reduziu a incidência da DM1 nestes ratinhos, apesar do ataque às células β pancreáticas já se ter iniciado, o que foi reflectido pela presença de insulinite na altura do tratamento. As análises a citocinas pancreáticas demonstraram sinais de imunorregulação local, com baixos níveis de IFN- γ e níveis aumentados de IL-4. De realçar que nenhum destes tratamentos foi eficaz quando administrado isoladamente. ⁶² Estes estudos demonstram ser menos provável o sucesso de uma intervenção com vitamina D ou análogos, com o ataque imune contra as células β a decorrer, do que antes deste ter início. ⁴⁷



Por outro lado, o análogo Ro 26-2198⁶¹, em monoterapia e em doses não hipercalcémicas, bloqueou o curso da doença em ratinhos NOD com DM1 já estabelecida, inibiu a produção de citocinas IL-12, IL-2 e IFN- γ , e células Th1 e aumentou a frequência das células Treg CD4+CD25+ nos nódulos linfáticos pancreáticos. Segundo os autores, esta propriedade foi provavelmente devida, pelo menos em parte, à sua maior estabilidade metabólica contra as hidroxilações inativadoras, resultando numa actividade imunossupressora muito superior à da vitamina D. O mesmo análogo foi utilizado em ratinhos BB (*BioBreeding*) mas apenas reduziu a incidência de DM1 de forma limitada. O facto deste análogo não ter estimulado as células Treg CD4+CD25+, como aconteceu nos ratinhos NOD, foi a explicação apresentada pelos autores.⁶³

Recentemente, Driver *et al*⁶⁴ conduziram um estudo no qual compararam a eficácia da suplementação com $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou $1\alpha\text{OHD}_3$, (alfacalcidiol) seu precursor, que pode ser convertido no fígado, em ratinhos NOD. Concluíram que apesar de ambos reduzirem a incidência de DM1, o alfacalcidiol demonstrou ser mais tóxico, mas capaz de induzir maior protecção. No entanto, as doses necessárias induziram hipercalcemia moderada a severa. O alfacalcidiol já tinha demonstrado a capacidade de induzir protecção contra DM1 num estudo anterior, após administração de múltiplas baixas doses de estreptozotocina em ratinhos.⁶⁵

3.2.4.2) Estudos em Humanos

A prevenção da DM1, em humanos, até à data tem sido infrutífera. Entre as possíveis hipóteses está a vitamina D e os seus análogos sintéticos, que



conseguem inibir esta patologia em ratinhos NOD e que podem representar um método, relativamente benigno, de alterar o curso da doença em humanos.¹⁵ Actualmente, mais de 2.000 análogos sintéticos da vitamina D são conhecidos, contudo, o seu efeito hipercalcémico restringe a sua utilização terapêutica.¹⁴

Diversos estudos observacionais sugerem que a suplementação com vitamina D reduz o risco de DM1, porém, estes resultados têm sido inconsistentes.⁶⁶ Os resultados de um estudo de coorte, realizado na Finlândia, sugerem que o desenvolvimento de DM1 está associado a baixa ingestão de vitamina D, durante o 1º ano de vida.⁶⁷ Foi encontrado um efeito dose-resposta, pois em crianças que receberam ≥ 2000 UI de forma regular, o risco de desenvolvimento desta patologia foi reduzido em cerca de 80%. A mesma associação também foi verificada num largo estudo caso-controlo, que incluiu 7 centros europeus com registos de DM1 na infância⁶⁸, assim como noutro estudo caso-controlo realizado na Itália.⁶⁹

Pelo contrário, não foi encontrada associação significativa entre suplementação com vitamina D, durante o 1º ano de vida e o risco de DM1, num outro estudo em Itália.⁷⁰ Este resultado foi justificado pelos autores, por Lázio possuir um clima com bastante sol, a principal fonte de vitamina D.⁷⁰ Tendo em consideração que o leite materno é uma fonte pobre de vitamina D, a concentração plasmática desta vitamina no recém-nascido depende da quantidade armazenada *in utero* ou da ingestão de suplementos antes de deixar de ser amamentado.⁶⁸ Assim, a vitamina D plasmática da progenitora pode ser reflectida no estado de vitamina D corporal do recém-nascido. Dois estudos realizados por Stene *et al*^{40,71}, apresentaram conclusões diferentes quando compararam a suplementação com vitamina D, através da ingestão de



óleo de fígado de bacalhau ou suplementos vitamínicos que continham vitamina D, tanto por mulheres grávidas, como por crianças durante o 1º ano de vida, e o risco de desenvolvimento de DM1 pelas crianças. No primeiro, Stene *et al*⁴⁰ concluíram que, apenas existiu associação entre a ingestão de óleo de fígado de bacalhau, pelas mulheres grávidas e uma diminuição do risco de DM1 nos descendentes. Por contraste, no estudo seguinte, com maior amostra, Stene *et al*⁷¹ concluíram que existiu associação entre a ingestão de óleo de fígado de bacalhau pelas crianças durante o 1º ano de vida, e uma diminuição do risco de desenvolvimento de DM1. A razão para os diferentes resultados entre os trabalhos é desconhecida pelos próprios autores, que justificaram os melhores resultados com óleo de fígado de bacalhau que com outros suplementos, pela possível maior biodisponibilidade de vitamina D, ou pela associação entre outro dos constituintes do óleo de fígado de bacalhau, com a diminuição do risco de desenvolvimento da DM1.⁴⁰

A suplementação com vitamina D, através da dieta, durante a gravidez, também parece estar associada a uma diminuição do risco de aparecimento de autoanticorpos anti-insulina, anti-IA-2 e anti-GAD₆₅ em crianças com risco aumentado, tanto por genótipo HLA-DR, como por história familiar de DM1.^{72,73} Desta forma, permite uma oportunidade de prevenção, uma vez que o aparecimento de autoimunidade é o primeiro sinal de destruição das células β pancreáticas e decorre muito antes do diagnóstico clínico de DM1.⁷³

Uma meta-análise⁶⁶ que incluiu 5 estudos observacionais,^{40,67-69,71} que relacionaram a suplementação com vitamina D na infância com o risco de desenvolvimento de DM1, sugere que este risco é reduzido significativamente



quando as crianças recebem suplementação. Os resultados destes estudos caso-controlo indicam uma redução do risco de até 29%.⁶⁸

Na maioria dos estudos, a concentração da vitamina D plasmática não era clara, nem foram utilizados métodos objectivos na quantificação da vitamina D ingerida, pelo que a protecção observada tanto pode ter resultado de um restabelecimento da vitamina D plasmática, em indivíduos com deficiência, como de um verdadeiro efeito da suplementação extra, a crianças com concentração plasmática suficiente.

3.3) Factores genéticos na etiopatogenia da diabetes mellitus tipo 1

A DM1 é uma doença de origem multifactorial para a qual contribuem factores de natureza ambientais e factores de susceptibilidade genética. A importância da contribuição dos factores genéticos é demonstrada pela observação de uma taxa de concordância da doença, entre gémeos monozigóticos, de cerca de 30 a 50%.⁶ Uma associação entre vários loci e a DM1 também tem sido observada, o que sugere que esta possa ser uma patologia poligénica.⁷⁴

Os genes do MHC (complexo de histocompatibilidade major), particularmente o HLA (antígenos de leucócitos humanos) de classe II, foram identificados como os mais importantes factores genéticos na determinação do risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1, sendo responsáveis por cerca de 40-50% do total da componente hereditária da DM1.^{4,75} Dois haplotipos HLA possuem uma importância particular, DR4-DQ8 e DR3-DQ2, uma vez que estão presentes em cerca de 90% das crianças com DM1.² Por



seu lado, o genotipo que combina os haplotipos que conferem uma susceptibilidade aumentada, DR4-DQ8/DR3-DQ2, contribui para o maior risco de doença, sendo mais comum em crianças nas quais a doença se desenvolve precocemente.² A função destes genes em termos de resposta imunitária é bem conhecida (i.e. apresentação de antígenos aos linfócitos T), no entanto, a sua contribuição específica para a patogénese da DM1 permanece desconhecida.³⁷

Vários outros genes, como o gene da insulina, o *PTPN22*, que codifica a proteína tirosina fosfatase, o *CTLA4* e o *CD25*, implicados na imunomodulação, foram também implicados na etiopatogenia da DM1, conferindo um risco muito inferior quando comparados com os anteriores.^{2,4} Contudo, estes genes não são suficientes nem necessários para provocar a doença.⁷⁵

Dado que os resultados dos estudos epidemiológicos e experimentais parecem sugerir uma associação entre a vitamina D e a DM1, vários autores têm estudado a contribuição de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e acção da vitamina D, para o risco de desenvolvimento da DM1 e de outras doenças auto-imunes tais como a esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, artrite reumatóide e doenças auto-imunes da tiróide. Os principais alvos destes estudos têm sido os genes codificadores do receptor da vitamina D, das enzimas envolvidas no seu metabolismo e da proteína de ligação da vitamina D.⁷⁶



3.3.1) Polimorfismo do Receptor da Vitamina D

Tendo em consideração que a vitamina D exerce os seus efeitos através da ligação com o seu receptor específico, a proteína nuclear VDR, o gene *VDR* tornou-se um dos possíveis candidatos a estar implicado no risco de DM1.⁷⁷

O gene do VDR encontra-se no cromossoma 12q12-q14, possui pelo menos cinco regiões promotoras, oito exões que codificam proteínas, exões 2-9, e seis exões não codificadores, exões 1a-1f, que são processados alternadamente.⁷⁵ Já foram descritos diversos polimorfismos para este gene, dos quais quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram alvo de maior investigação e serão aqui abordados. O polimorfismo FokI (rs735810), que ocorre no primeiro codão de iniciação do exão 2, altera a sequência de nucleotídeos de ATG para ACG. Os alelos com este polimorfismo iniciam a translação três codões mais adiante, o que resulta numa proteína mais curta em 3 aminoácidos, considerada mais activa (alelo "F"). Os outros polimorfismos são o BsmI (rs1544410) e ApaI (rs7975232) ambos localizados no intrão 8 e TaqI (rs731236), SNP silencioso no exão 9 e cujos efeitos funcionais são desconhecidos.^{75,78,79} Os genótipos do gene *VDR* foram determinados de acordo com a presença ou ausência de locais de restrição polimórficos⁸⁰ e designados por uma letra maiúscula (alelos "F", "B", "A" ou "T"), na presença do local de restrição, ou minúscula (alelos "f", "b", "a" ou "t"), na ausência do mesmo.^{81,82}

Estes polimorfismos e a sua possível relação com várias patologias endócrinas de mediação imune, como a doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença de Addison ou a DM1, têm sido alvo de estudos em



diferentes populações, sobretudo durante a última década ^{77,83} Até ao momento, um largo número de estudos sugeriu o envolvimento do gene *VDR* na patogenia da DM1 ⁸⁰ (Quadro 2).

McDermott *et al* ⁸⁴ foram os primeiros a descrever uma associação entre DM1 e polimorfismo *VDR*, em 1997, num estudo que envolveu 93 famílias Indianas com DM1. Foi então concluído que o alelo “b” do polimorfismo BsmI era preferencialmente transmitido à descendência com DM1. Não foi identificada qualquer associação entre os SNP’s TaqI ou ApaI e a DM1.

Desde então, diversos estudos de associação genética têm sido realizados também com resultados positivos (Quadro 2). No entanto, vários estudos têm revelado resultados contraditórios. Num grande estudo envolvendo 774 casos e 599 controlos, Shimada *et al* ⁷ demonstraram que o genotipo “BB” do polimorfismo BsmI está associado à DM1. Neste estudo, também foi possível encontrar uma associação entre valores elevados de IFN-γ e o mesmo genotipo, o que estaria de acordo com a hipótese “Th1” da patogenia da DM1. No entanto, não foi possível concluir que este aumento estivesse relacionado com o genotipo “BB”. Ban *et al*, ⁸⁵ em 2001, conduziram uma investigação em indivíduos japoneses, tendo concluído que o alelo “F”, assim como o genotipo “FF”, aumentavam a susceptibilidade para a DM1 nestes indivíduos. No ano seguinte, também no Japão, Yokota *et al*, ⁸⁶ concluíram que apesar de não ser estatisticamente significativo, a frequência do alelo “F” do polimorfismo FokI era superior nos pacientes diabéticos. Neste trabalho também foi comparado o polimorfismo *VDR* com a idade de início da DM1, sendo que o genotipo “ff” foi associado a um início mais precoce da patologia. Skrabic *et al*, ⁸⁷ no ano de 2003, não encontraram associação entre



os polimorfismos BsmI e ApaI e a DM1. No entanto, verificaram a existência de uma associação entre o genótipo “tt” do polimorfismo TaqI e a DM1 em indivíduos croatas, o que contraria o que Fassbender *et al*⁸⁸ já haviam demonstrado no ano anterior na Alemanha, ao concluírem que o genótipo “TT” estaria associado a DM1 em indivíduos deste país. Outros estudos realizados em populações de países como Taiwan⁸⁹, Holanda⁹⁰, Espanha^{91,92}, Itália⁹³, Chile⁸², Uruguai⁹⁴ ou Brasil⁷⁹, também demonstraram associações entre os polimorfismos FokI, BsmI, ApaI e TaqI e a DM1.

Quadro 2. Estudos de associação entre polimorfismos do gene VDR e a diabetes mellitus tipo 1.

Referência	País	Tipo de estudo	Amostra	Polimorfismo estudado	Alelo ou genótipo de risco ^(a)
Mcdermott et al 1997 ⁸⁴	India	transmissão	93 famílias	<i>BsmI</i>	b
		familiar		<i>Apal</i>	A ^(b)
				<i>TaqI</i>	T ^(b)
Hauache et al 1998 ⁹⁵	Brasil	caso - controlo	78 casos e 94 controlos	<i>BsmI</i>	(-)
Chang et al 2000 ⁸⁹	Taiwan	caso - controlo	157 casos e	<i>BsmI</i>	B
			248 controlos	<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
Pani et al 2000 ⁹⁶	Alemanha	transmissão	152 famílias	<i>BsmI</i>	B ^(b)
		familiar		<i>Apal</i>	A ^(b)
				<i>TaqI</i>	t ^(b)
				<i>FokI</i>	(-)
Ban et al 2001 ⁸⁵	Japão	caso-controlo	110 casos e 250 controlos	<i>FokI</i>	F e FF
Guja et al 2002 ⁹⁷	Roménia	transmissão	204 famílias	<i>Apal</i>	(-)
		familiar		<i>TaqI</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Koeleman et al 2002 ⁹⁰	Holanda	transmissão familiar	206 famílias	<i>FokI</i>	F



Yokota et al 2002 ⁸⁶	Japão	caso - controlo	108 casos e	<i>Apal</i>	(-)
			120 controlos	<i>TaqI</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Fassbender et al 2002 ⁸⁸	Alemanha	caso - controlo	75 casos e 57	<i>Bsml</i>	(-)
			controlos	<i>TaqI</i>	TT
				<i>FokI</i>	(-)
Gyoffy et al 2002 ⁹⁸	Hungria	caso - controlo	107 casos e	<i>Bsml</i>	(-)
			103 controlos	<i>Apal</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Turpeinen et al 2003 ⁹⁹	Finlândia	caso - controlo	1064 casos e	<i>Bsml</i>	(-)
			2837	<i>Apal</i>	(-)
			controlos	<i>FokI</i>	(-)
Motohashi et al 2003 ¹⁰⁰	Japão	caso - controlo	203 casos e	<i>Bsml</i>	B
			222 controlos		
Skrabic et al 2003 ⁸⁷	Croácia	caso - controlo	134 casos e	<i>Bsml</i>	B ^(b)
			132 controlos	<i>Apal</i>	A ^(b)
				<i>TaqI</i>	t ^(b)
Nesenjev et al 2004 ¹⁰¹	Reino Unido, EUA, Finlândia, Noruega, Roménia	transmissão familiar	3763 famílias	<i>Bsml</i>	(-)
				<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Angel et al 2004 ¹⁰²	Chile	transmissão familiar	59 famílias	<i>Bsml</i>	(-)
				<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
Audi et al 2004 ⁹¹	Espanha	caso - controlo	242 casos e	<i>Bsml</i>	(-)
			390 controlos	<i>FokI</i>	F
Bianco et al 2004 ¹⁰³	Itália	caso - controlo	31 casos e 36	<i>Bsml</i>	(-)
			controlos	<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
Zemunik et al 2005 ⁷⁸	Croácia	caso - controlo	134 casos e	<i>FokI</i>	ff
			232 controlos		
San-Pedro et al 2005 ⁹²	Espanha	caso - controlo	71 casos e	<i>Bsml</i>	B ^(b)
			88 controlos	<i>Apal</i>	A ^(b)
				<i>TaqI</i>	t ^(b)
				<i>FokI</i>	f ^(b)
Capoluongo et al 2006 ⁹³	Itália	caso - controlo	246 casos e	<i>Bsml</i>	(-)



			246 controlos	<i>FokI</i>	ff
Xiao et al 2006 ⁸¹	Japão	caso - controlo	54 casos e 82 controlos	<i>BsmI</i>	B
				<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
Garcia et al 2007 ⁸²	Chile	caso - controlo	216 casos e 203 controlos	<i>BsmI</i>	B ^(b)
				<i>Apal</i>	A ^(b)
				<i>TaqI</i>	T ^(b)
Mimbacas et al 2007 ⁹⁴	Uruguai	transmissão familiar	45 famílias	<i>BsmI</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
				<i>FokI</i>	F
Boraska et al 2008 ⁸⁰	Croácia	transmissão familiar	160 famílias	<i>BsmI</i>	(-)
				<i>Apal</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Shimada et al 2008 ⁷	Japão	caso - controlo	774 casos e 599 controlos	<i>BsmI</i>	BB
López et al 2008 ¹⁰⁴	Chile	caso - controlo	151 casos e 182 controlos	<i>FokI</i>	(-)
Lemos et al 2008 ⁷⁷	Portugal	caso - controlo	207 casos e 249 controlos	<i>BsmI</i>	(-)
				<i>Apal</i>	(-)
				<i>TaqI</i>	(-)
				<i>FokI</i>	(-)
Mory et al 2009 ⁷⁹	Brasil	caso - controlo	189 casos e 194 controlos	<i>BsmI</i>	BB
				<i>FokI</i>	(-)

(a), Designação com base na presença (letra maiúscula) ou ausência (letra minúscula) do local de restrição para cada uma das enzimas *BsmI*, *Apal*, *TaqI* e *FokI*;

(b), Risco conferido por combinação dos polimorfismos na forma de haplótipo;

(-), Ausência de associação entre a DM1 e o polimorfismo estudado.

Em contraste, outros estudos não encontraram evidência de tais associações. Nesenjev *et al* ¹⁰¹, em 2004, conduziram uma investigação que incluiu 3763 famílias com DM1 de países como a Finlândia, Reino Unido, Noruega, Roménia e EUA. Foram investigados 98 SNP's onde estavam incluídos o *FokI*, *TaqI*, *BsmI* e *Apal*. Os resultados foram negativos para todos



os SNP's, não se tendo verificado qualquer associação entre estes e a DM1. Foram encontrados resultados semelhantes no Brasil ⁹⁵, Roménia ⁹⁷, Japão ⁸⁶, Hungria ⁹⁸, Finlândia ⁹⁹, Chile ^{102,104}, Itália ¹⁰³, Croácia ⁸⁰ e Portugal ⁷⁷.

Os resultados registados nestes estudos demonstraram inconsistência, e em 2005, Guo *et al* ⁷⁵ elaboraram uma meta-análise que incluiu 19 estudos de associação entre o gene *VDR* e a DM1. Apenas os polimorfismos FokI, BsmI, ApaI e TaqI foram avaliados. Segundo os autores, não foi encontrada evidência de associação entre os referidos polimorfismos e a DM1. A excepção verificou-se com o FokI, onde foi encontrada uma pequena associação.

As aparentes discrepâncias entre estes estudos podem ser o resultado do efeito de diferenças étnicas relacionadas com a distribuição dos polimorfismos do *VDR* nessas populações, assim como das interacções com outros factores genéticos e ambientais envolvidos na patogenia da DM1. ⁷⁷ Assim, e apesar da inconsistência dos resultados relativamente ao polimorfismo FokI, BsmI, ApaI e TaqI, tal não significa que o gene *VDR*, como mediador da acção da vitamina D, não possa estar envolvido na patogenia da DM1, até porque já foram identificados mais de 200 SNP's nesse mesmo gene.⁷⁷

Recentemente, foi demonstrado mediante modelos de transfecção, que o polimorfismo FokI tem grande impacto funcional sobre as células do sistema imunitário (monócitos e linfócitos), sendo a variante “F” do *VDR* a que mais afecta o comportamento do sistema imunitário, implicado na patogenia da DM1.¹⁰⁵ Por outro lado, estudos recentes em modelos animais de DM1 (ratinhos NOD) demonstraram que a eliminação do receptor *VDR* não aumenta a susceptibilidade para a doença.¹⁰⁵



3.3.2) Polimorfismo das enzimas metabolizadoras da vitamina D

A CYP27B1 (25-hidroxivitamina D₃-1- α -hidroxilase) é uma enzima mitocondrial P450 que cataliza a conversão de 25(OH)D para 1 α ,25(OH)₂D₃, a forma mais activa da vitamina D. Esta é uma enzima chave na determinação da taxa de produção de 1 α ,25(OH)₂D₃¹⁰⁶, sendo expressa no rim, assim como em tecidos extra-renais como o pâncreas, a glândula adrenal ou mesmo em macrófagos¹⁰⁷, o que sugere uma função parácrina e autócrina para além do reconhecido papel endócrino. O gene *CYP27B1* está localizado no cromossoma 12q.13.1-13.3.¹⁰⁶ e os seus polimorfismos -1260 C>A (rs10877012), localizado na região promotora e +2838 C>T (rs4646536), localizado no intrão 6¹⁰⁸ têm sido alvos da maioria das investigações. Diversos estudos registaram uma associação entre algumas patologias auto imunes, como a doença de Addison, tiroidite de Hashimoto e doença de Graves e os polimorfismos do gene *CYP27B1*. Este gene, e sobretudo o polimorfismo da sua região promotora, parece ser um gene candidato para a susceptibilidade genética na DM1¹⁰⁶ (Quadro 3).

Todos os estudos publicados sobre a associação entre o polimorfismo *CYP27B1* -1260C>A e a DM1 demonstraram evidência de tal associação.^{83,106,108} Segundo estes, o alelo “C”^{83,106,108}, assim como o genotipo “CC”¹⁰⁶ conferem uma maior susceptibilidade para a doença. O haplotipo “CT” (-1260/+2838) também foi referenciado, conferindo também uma maior susceptibilidade.⁸³ Não foi encontrada evidência de associação entre o polimorfismo *CYP27B1* +2838C>T e a DM1 em vários estudos realizados, sobretudo com indivíduos alemães.^{83,106,107} No entanto, num estudo recente,



Bailey *et al*¹⁰⁸ encontraram pela primeira vez esta associação, num estudo que envolveu pacientes de vários países da Europa. O alelo “T” foi associado a um maior risco de desenvolvimento de DM1.

Quadro 3. Estudos de associação entre os polimorfismos -1260 e +2838 do gene *CYP27B1* e a diabetes mellitus tipo 1.

Referência	País	Tipo de estudo	Amostra	Polimorfismo estudado	Alelo ou genótipo de risco ^(a)
Pani et al 2002 ¹⁰⁷	Alemanha	transmissão familiar	209 famílias	CYP27B1 +2838	(-)
Lopez et al 2004 ⁸³	Alemanha	transmissão familiar	187 famílias	CYP27B1 -1260	C
				CYP27B1 +2838	T ^(b)
Lopez et al 2004 ¹⁰⁶	Alemanha	caso-controlo	252 casos e 320	CYP27B1 -1260	C e CC
			controles	CYP27B1 +2838	(-)
Bailey et al 2007 ¹⁰⁸	Grã-Bretanha,	transmissão familiar	2774 famílias	CYP27B1 -1260	C
	Irlanda do			CYP27B1 +2838	T
	Norte,				
	Finlândia,				
	EUA,				
Noruega,					
Roménia					
	Grã-Bretanha	caso-controlo	7854 casos e	CYP27B1 -1260	C
			8758 controles	CYP27B1 +2838	T

(a), Designação com base no nucleótido polimórfico;

(b), Risco conferido por combinação dos polimorfismos na forma de haplótipo;

(-), Ausência de associação entre a DM1 e o polimorfismo estudado.

A *CYP24A1* (25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase), é a enzima responsável pelo primeiro passo de uma série de reacções que levam à desactivação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. O gene *CYP24A1* está localizado no cromossoma 20q13.2-q13.3.¹⁰⁸ Um total de 16 SNP's deste gene foram



investigados por Bailey *et al*,¹⁰⁸ não tendo sido encontrada qualquer associação com a DM1.

A CYP2R1 (vitamina D 25-hidroxilase) é a enzima responsável por catalizar a formação de 25-(OH)D no fígado e cujo gene está localizado no cromossoma 11p15.2. Ramos-Lopez *et al*¹⁰⁹, em 2007, conduziram uma investigação sobre dois polimorfismos deste gene, rs12794714 e rs10741657, respectivamente. Apenas este último demonstrou uma associação com a DM1. Segundo os autores, o alelo “G” foi encontrada com maior frequência nos pacientes diabéticos, sendo que os genótipos “GG” e “GA” estavam associados a níveis menores de 25(OH)D₃.

Num outro estudo, foram investigados os níveis plasmáticos de 25(OH)D e 1 α ,25(OH)₂D₃, assim como a expressão de ARNm (ácido ribonucleico mensageiro) dos genes *CYP2R1*, *CYP27B1* e *CYP24* em indivíduos diabéticos.⁵¹ Os resultados foram também analisados em função do polimorfismo *CYP27B1* -1260C>A. De acordo com os resultados, foi encontrada uma redução dos níveis plasmáticos de 25(OH)D e de 1 α ,25(OH)₂D₃, assim como da expressão de ARNm do gene *CYP27B1*, nos indivíduos diabéticos quando comparados com o grupo controlo. Nestes indivíduos, o genótipo “CC” do polimorfismo *CYP27B1* -1260C>A estava associado a menores quantidades de ARNm do gene *CYP27B1*, em comparação com os controlos.

Assim, o gene *CYP27B1*, sobretudo o alelo “C” ou genótipo “CC” do seu polimorfismo -1260C>A, poderá contribuir para a etiopatogenia da DM1 através da modulação do seu ARNm.⁵¹ A presença deste polimorfismo na região promotora do gene que codifica esta enzima chave na activação da vitamina D,



pode afectar a expressão desta e consequentemente afectar negativamente a quantidade local de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aumentando a susceptibilidade à DM1.¹⁰⁸

3.3.3) Polimorfismo da Proteína de Ligação da Vitamina D

A proteína de ligação da vitamina D (DBP), também conhecida por Group-specific Component (Gc)⁷⁴, é uma glicoproteína de 58 kDa com alta afinidade para o transporte da vitamina D e seus metabolitos¹⁷, presente no plasma da maioria dos vertebrados. É a principal transportadora da vitamina D e seus metabolitos no plasma¹¹⁰, sendo fundamental para a sua endocitose celular. Os níveis plasmáticos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estão relacionados com os níveis de DBP.⁷⁴ Além da sua interacção com a vitamina D, foi demonstrada a influência da DBP no sistema imunitário, independentemente da vitamina D, através da sua conversão num factor activador de macrófagos por enzimas de linfócitos T e B. Esta DBP já foi encontrada na superfície de linfócitos T e B e monócitos.¹¹⁰

Esta é uma proteína altamente polimórfica, com mais de 120 variações genéticas identificadas, sendo codificada por um gene localizado no cromossoma 4q12-q13. O gene *DBP* contém três polimorfismos, que têm sido alvo da maioria dos estudos: o polimorfismo (TAAA)_n (sequência repetitiva localizada no intrão 8)⁷⁴; o polimorfismo HaeIII (rs7041), localizado no exão 11, com alteração do codão GAT para GAG e que condiciona a substituição de um aminoácido aspartato pelo glutamato; e o polimorfismo Styl (rs4588), localizado no exão 11, com alteração do codão ACG para AAG e que condiciona a



substituição de um aminoácido treonina pela lisina.¹¹¹ Estas variantes no gene *DBP* podem ser responsáveis por diferenças na afinidade pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.⁷⁴

Foi encontrada evidência de associação entre o polimorfismo *HaeIII* do gene *DBP* e a DM1, por Ongagna *et al.*¹¹⁰ De acordo com os resultados, 64% dos pacientes diabéticos possuía o alelo “Glu”, contra apenas 25% nos controlos. A mesma associação foi verificada num estudo posterior,⁷⁴ onde o alelo “Glu” assim como o genótipo “Glu/Glu” estavam significativamente aumentados em pacientes diabéticos. Além disso, foi também identificada uma relação directa entre este alelo e um marcador de autoimunidade, o autoanticorpo IA2. Em contraste, outras investigações não conseguiram encontrar qualquer associação entre os polimorfismos (TAAA)*n*¹¹², *HaeIII*^{111,112}, ou *Styl*¹¹⁰⁻¹¹² do gene *DBP* e uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de DM1 (Quadro 4).

Quadro 4. Estudos de associação entre os polimorfismos *HaeIII*, *Styl* e repetição (TAAA)*n* do gene *DBP* e a diabetes mellitus tipo 1.

Referência	País	Tipo de estudo	Amostra	Polimorfismo estudado	Alelo ou genótipo de risco ^(a)
Pani et al 1999 ¹¹²	Alemanha	transmissão familiar	152 famílias	<i>HaeIII</i>	(-)
				<i>Styl</i>	(-)
				Repetição (TAAA) <i>n</i>	(-)
Klupa et al 1999 ¹¹¹	EUA	caso-controlo	181 casos e	<i>Styl</i>	(-)
			163 controlos	<i>HaeIII</i>	(-)
Ongagna et al 2001 ¹¹⁰	França	caso-controlo	43 casos e 52	<i>Styl</i>	(-)
			controlos	<i>HaeIII</i>	Glu e Glu/Glu
Ongagna et al 2005 ⁷⁴	França	caso-controlo	110 casos e 68	<i>Styl</i>	(-)
			controlos	<i>HaeIII</i>	Glu e Glu/Glu

(a), Designação com base no aminoácido polimórfico;

(-), Ausência de associação entre a DM1 e o polimorfismo estudado.



Dado que a DBP é a principal transportadora da vitamina D e é fundamental para a sua endocitose, é possível que os polimorfismos da DBP possam conferir diferenças na biodisponibilidade da vitamina D e contribuir para a susceptibilidade para a DM1.¹¹⁰ A sua afinidade pela vitamina D varia de acordo com a expressão dos polimorfismos do exão 11, o que pode provocar uma alteração da concentração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e consequentemente, afectar a regulação do sistema imunitário. Para além do transporte da vitamina D, outras propriedades da DBP, como o papel desempenhado na activação dos macrófagos, podem afectar o funcionamento adequado do sistema imunitário.⁷⁴

Assim, apesar do mecanismo através do qual a DBP possa afectar a autoimunidade permanecer desconhecido, esta relação é mais uma indicação da importância da regulação da vitamina D no estabelecimento da DM1.⁷⁴

3.4) Efeito imunomodelador da vitamina D

A detecção de receptores da vitamina D em praticamente todas as células do sistema imunitário e em especial nas células apresentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, assim como em células T CD4+ e CD8+, levou à investigação do potencial papel da vitamina D como agente imunomodelador, particularmente na prevenção de doenças auto-imunes, tanto em humanos como em modelos animais de autoimunidade.^{10,15} Para além deste facto, as células do sistema imunitário e em particular os macrófagos activados e as células dendríticas são capazes de sintetizar e secretar vitamina D, pois possuem a enzima necessária para a activação desta,



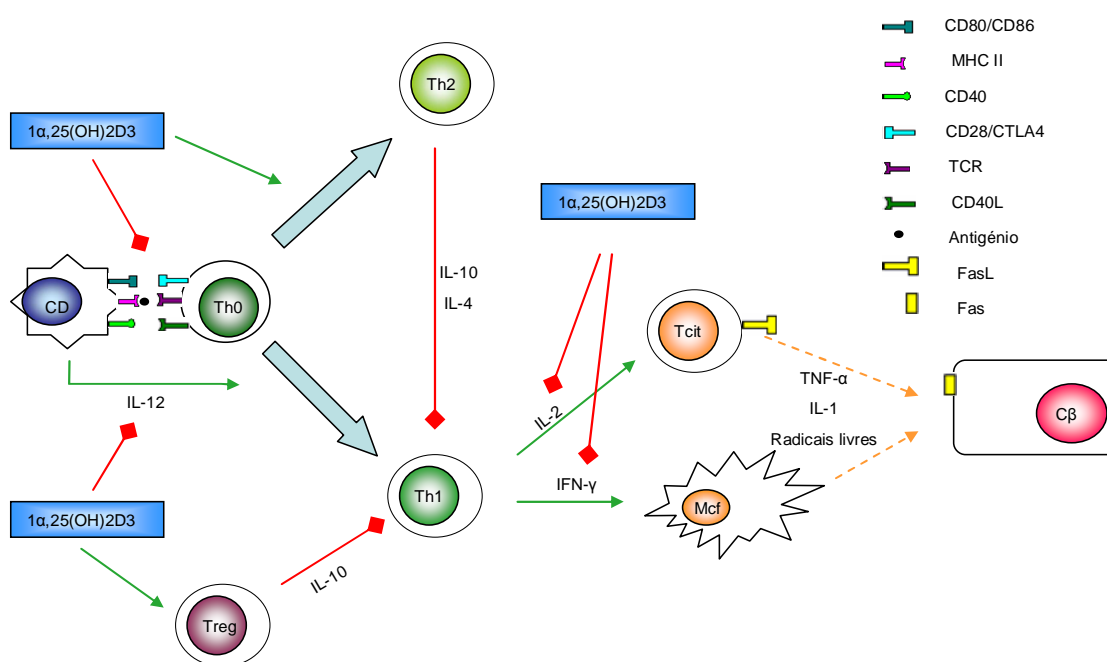
a 1α -hidroxilase.¹⁵ No entanto, apesar desta enzima ser idêntica à forma renal, a sua regulação parece estar sob um controle diferente, mediada por sinais imunes como o IFN- γ ¹⁰ e não pela PTH.³²

Alguns estudos em animais, sobre o efeito da vitamina D no sistema imunitário e inflamatório, sugerem que esta pode modular a patogénese da DM1. As suas acções imunomoduladoras e anti-inflamatórias poderão reduzir a reacção inflamatória nos ilhéus pancreáticos e diminuir a insulinite característica da DM1.³²

O efeito imunomodulador mais estudado da vitamina D recai sobre uma célula apresentadora de antígenos, a célula dendrítica.⁸ A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem a capacidade de inibir a produção de IL-12, uma citocina secretada por estas células, crítica para o desenvolvimento de células Th1; assim como a capacidade de inibir a maturação e diferenciação de células dendríticas, cruciais na indução de resposta imune mediada por células T. Também foi demonstrado que o tratamento com $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ suprime a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, assim como do MHC de classe II à superfície; diminui a produção de IL-12 e aumenta a produção de IL-10^{8-10,64} (Figura 5). Todos estes efeitos contribuem para a indução de células dendríticas com propriedades tolerogénicas.⁹ Uma vez que as células dendríticas formam a ligação entre a resposta imunitária inata e adaptativa, o efeito da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nas células dendríticas possui inevitavelmente um extenso impacto no comportamento das células T. É sobretudo através desta via indirecta que a vitamina D modula a função das células T CD4+.⁸

A vitamina D também possui efeitos directos sobre as células T e B. Os agonistas VDR inibem selectivamente o desenvolvimento de células Th1, assim

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possui um forte efeito directo na resposta mediada por linfócitos B, incluindo indução de apoptose e a inibição de proliferação, geração de células B de memória, diferenciação em plasmócitos e produção de imunoglobulinas, uma vez que estas células também possuem o VDR e a capacidade para sintetizar vitamina D. ⁹



Nuno Miguel Pimenta de Oliveira



O tratamento com agonistas do VDR inibe a produção de IL-17 pelas células T, uma citocina pró-inflamatória que é produzida por células T patogénicas em vários modelos de autoimunidade para órgãos específicos.⁹

As células dendríticas tolerogénicas induzidas por um breve tratamento com vitamina D ou análogo, conseguem induzir células T reguladoras CD4+CD25+, aumentar a sua capacidade supressora, promover o seu recrutamento para zonas de inflamação, assim como impedir o desenvolvimento de DM1.⁶¹

Assim, pode-se concluir que os efeitos da vitamina D no sistema imunitário são múltiplos, mas todos levam à geração de tolerância e anergia, em vez de activação imunitária.¹⁵



4 – CONCLUSÃO

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel fundamental para a homeostase do cálcio e fósforo, que pode ser encontrada em alimentos naturais ou produzida endogenamente, na pele, através da exposição à radiação UVB. Esta actua nos órgãos alvos através da união ao VDR, presente em vários tipos celulares, incluindo praticamente todas as células do sistema imunitário. Actualmente estima-se que um bilião de pessoas em todo o mundo possua níveis plasmáticos de vitamina D insuficientes ou deficientes, o que lhes confere um risco superior de sofrer consequências a nível esquelético, com raquitismo, osteomalácia ou osteoporose, dependentes da homeostase do cálcio e fósforo, e não esquelético, como vários tipos de cancros, hipertensão ou doenças auto imunes, como a DM1, a artrite reumatóide ou a esclerose múltipla, dadas as propriedades imunomoduladoras, antiproliferativas e anti-inflamatórias da vitamina D.

A diabetes mellitus tipo 1 é uma doença multifactorial, para a qual contribuem factores ambientais e factores de predisposição genética. A autoimunidade é um mecanismo importante na fisiopatologia desta doença e estão identificados alguns genes envolvidos na resposta imunológica, que modificam a susceptibilidade para este tipo de diabetes.

Vários estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que a vitamina D poderá ter um efeito protector contra o desenvolvimento da DM1, através da sua acção imunomoduladora. A melhor compreensão do efeito da vitamina D sobre a autoimunidade poderá ajudar na definição de novas estratégias preventivas. No entanto, o efeito final da vitamina D depende de vários



intervenientes no metabolismo e acção da vitamina D. A variabilidade inter-individual destes intervenientes, mediada por polimorfismos genéticos, poderá condicionar diferenças na biodisponibilidade da vitamina D e influenciar a susceptibilidade para esta e para outras doenças auto-imunes.

Até ao momento, já foram descritas associações entre o risco de DM1 e polimorfismos dos genes que codificam o receptor da vitamina D, a proteína de ligação da vitamina D e as enzimas 25-hidroxivitamina D₃-1- α -hidroxilase e vitamina D-25-hidroxilase. Porém, os resultados dos estudos de associação diferem em função da população e região geográfica estudada, o que poderá traduzir a influência de diferentes características genéticas populacionais e diferentes exposições ambientais.

Os resultados da investigação nesta área poderão contribuir para uma melhor compreensão do papel da vitamina D na etiopatogenia da DM1, para a identificação dos factores de susceptibilidade genética para a DM1 e para a definição de novas estratégias terapêuticas ou preventivas, com base no conhecimento dos genotipos de risco.



5 – BIBLIOGRAFIA

1. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 1053-67.
2. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ.* 2006; 175: 165-70.
3. The DIAMOND Project Group, Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet. Med.* 2006; 23: 857–66.
4. Zipris D. Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin Immunol.* 2009; 131: 11-23.
5. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999; 42: 1395-403.
6. Adeghate E, Schattner S, Dunn E. An Update on the Etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1084: 1–29.
7. Shimada A, Kanazawa Y, Motohashi Y, Yamada S, Maruyama T, Ikegami H, et al. Evidence for association between vitamin D receptor Bsm1 polymorphism and type 1 diabetes in Japanese. *J Autoimmun.* 2008; 30: 207-11.
8. Baeke F, van Etten E, Gysemans C, Overbergh L, Mathieu C. Vitamin D signaling in immune-mediated disorders: Evolving insights and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med.* 2008; 29: 376-87.
9. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008; 4: 404-12.
10. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* 2002; 8: 174-9.
11. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2062-72.
12. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1678S-88S



13. Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006; 92: 65-79.
14. Huotari A, Herzig KH. Vitamin D and living in northern latitudes – an endemic risk area for vitamin D deficiency. *Int J Circumpolar Health*. 2008; 67: 164-78.
15. Mathieu C, Badenhop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16: 261-6.
16. Holick MF. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 353-73.
17. Wagner CL, Taylor SN, Hollis BW. Does Vitamin D Make the World Go 'Round'?. *Breastfeed Med*. 2008; 3: 239-50.
18. Becker KL, Bilezikian JP, Bremner WJ, Hung W, Kahn CR, Loriaux DL, et al. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. 3^a edição. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 534-40.
19. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev*. 2008; 66: S182-94.
20. Mathieu C, Gysemans C, Giuliatti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2006; 49: 217-8.
21. Kimlin MG. Geographic location and vitamin D synthesis. *Mol Aspects Med*. 2008; 29: 453-61.
22. Cavalier E, Delanaye P, Chapelle JP, Souberbielle JC. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47: 120-7.
23. Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Ann Epidemiol*. 2009; 19: 73-8.
24. Gloth FM, Tobin JD, Sherman SS, Hollis BW. Is the recommended daily allowance for vitamin D too low for the homebound elderly? *J Am Geriatr Soc* 1991; 39: 137-41.
25. Lips P, Wiersinga A, Van Ginkel FC, Jongen MJ, Netelenbos JC, Hackeng WH, et al. The effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and parathyroid function in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 644-50.



26. Gloth FM, Gundberg CM, Holllis BW, Haddad JG, Tobin JD. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA*. 1995; 274: 1683-6.
27. Vieth R, Ladak Y, Walfish P. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 185-91.
28. Heaney R, Dowell M, Hale C, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22: 142-6.
29. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: Mechanisms of action. *Mol Aspects Med*. 2008; 29: 361-8.
30. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006; 92: 4-8.
31. Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res*. 1941; 1: 191-5.
32. Danescu LG, Levy S, Levy J. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine*. 2009; 35: 11-7.
33. Vieth R, Chan PC, MacFarlane GD. Efficacy and safety of vitamin D₃ intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 288-94.
34. Greer RM, Rogers MA, Bowling FG, Buntain HM, Harris M, Leong GM, et al. Australian children and adolescents with type 1 diabetes have low vitamin D levels. *Med J Aust*. 2007; 187: 59-60.
35. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 4371-8.
36. Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2007; 27: 554-64.
37. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001; 358: 221-9.
38. Casares S, Brumeanu TD. Insights into the pathogenesis of type 1 diabetes: a hint for novel immunospecific therapies. *Curr Mol Med*. 2001; 1: 357-78.



39. Lorini R, Minicucci L, Napoli F, Padovani P, Bazzigaluppi E, Tortoioli C, et al. Screening for type 1 diabetes genetic risk in newborns of continental Italy. Primary prevention (Prevefin Italy) — preliminary data. *Acta Biomed.* 2005; 76: 31-5.
40. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia.* 2000; 43: 1093-8.
41. Ponsonby AL, Lucas RM, van der Mei IA. UVR, vitamin D and three autoimmune diseases — multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis. *Photochem Photobiol.* 2005; 81: 1267-75.
42. Merriman TR. Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009; 83: 149-56.
43. Staples JA, Ponsonby AL, Lim LL, McMichael AJ. Ecologic analysis of some immune-related disorders, including type 1 diabetes, in Australia: latitude, regional ultraviolet radiation, and disease prevalence. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 518-23.
44. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia.* 2008; 51: 1391-8.
45. Karvonen M, Jääntti V, Muntoni S, Stabilini M, Stabilini L, Muntoni S, et al. Comparison of the seasonal pattern in the clinical onset of IDDM in Finland and Sardinia. *Diabetes Care.* 1998; 21: 1101-9.
46. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 417: 77–80.
47. Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, Giulietti A, Hulshagen L, Bouillon R, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology.* 2005; 146: 1956-64.
48. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 2004; 47: 451–62.



49. Bener A, Alsaied A, Al-Ali M, Al-Kubaisi A, Basha B, Abraham A, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. *Acta Diabetol.* 2009; 46: 183-9.
50. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM. Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.* 2009;154:132-4.
51. Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Pfeilschifter JM, Radeke HH, Badenhoop K. CYP2R1-, CYP27B1- and CYP24-mRNA expression in German type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103: 807–10.
52. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes Care.* 2009; 32: 1977-9.
53. Viskari H, Kondrashova A, Koskela P, Knip M, Hyöty H. Circulating vitamin D concentrations in two neighboring populations with markedly different incidence of type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29: 1458-9.
54. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohmê G, Bolinder J, et al. Lower levels of plasma 25- hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: Results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia.* 2006; 49: 2847–52.
55. Pozzili P, Manfrini S, Crino A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, et al. Low levels of 25-hidroxyvitamin D₃ e 1,25 dihidroxyvitamin D₃ in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res.* 2005; 37: 680-3.
56. Baumgartl HJ, Standl E, Schmidt-Gayk H, Kolb HJ, Janka HU, Ziegler AG. Changes of vitamin D₃ serum concentrations at the onset of immune-mediated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1991; 16: 145-8.
57. Huynh T, Greer RM, Nyunt O, Bowling F, Cowley D, Leong GM, et al. The association between ketoacidosis and 25(OH)-vitamin D levels at presentation in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes.* 2009; 10: 38-43.
58. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents insulitis in NOD mice. *Diabetes.* 1992; 41: 1491-5.



59. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *Diabetologia*. 1994; 37: 552–8.
60. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, KH1060. *Endocrinology*. 1995; 136: 866-72.
61. Gregori S, Giarratana N, Smirolto S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002; 51: 1367–74.
62. Casteels KM, Mathieu C, Waer M, Valckx D, Overbergh L, Laureys JM, et al. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with a short induction course of cyclosporin A. *Endocrinology*. 1998; 139: 95-102.
63. Pedullà M, Desiderio V, Graziano A, d'Aquino R, Puca A, Papaccio G. Effects of a vitamin D₃ analog on diabetes in the bio breeding (BB) rat. *J Cell Biochem*. 2007; 100: 808-14.
64. Driver JP, Foreman O, Mathieu C, van Etten E, Serreze DV. Comparative therapeutic effects of orally administered 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and 1alpha-hydroxyvitamin D(3) on type-1 diabetes in non-obese diabetic mice fed a normal-calcaemic diet. *Clin Exp Immunol*. 2008; 151: 76-85.
65. Inaba M, Nishizawa Y, Song K, Tanishita H, Okuno S, Miki T, et al. Partial protection of 1 alpha-hydroxyvitamin D₃ against the development of diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injection in CD-1 mice. *Metabolism*. 1992; 41: 631-5.
66. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes. a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008; 93: 512–7.
67. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001; 358: 1500-3.
68. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999; 42: 51–4.



69. Tenconi MT, Devoti G, Comelli M, Pinon M, Capocchiano A, Calcaterra V, et al. Major childhood infectious diseases and other determinants associated with type 1 diabetes: a case-control study. *Acta Diabetol.* 2007; 44: 14-9.
70. Visalli N, Sebastiani L, Adorisio E, Conte A, De Cicco AL, D'Elia R, et al. Environmental risk factors for type 1 diabetes in Rome and province. *Arch Dis Child.* 2003; 88: 695-8.
71. Stene LC, Joner G; Norwegian Childhood Diabetes Study Group. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 1128-34.
72. Brekke HK, Ludvigsson J. Vitamin D supplementation and diabetes-related autoimmunity in the ABIS study. *Pediatr Diabetes.* 2007; 8: 11-4.
73. Fronczak CM, Barón AE, Chase HP, Ross C, Brady HL, Hoffman M, et al. In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care.* 2003; 26: 3237-42.
74. Ongagna JC, Pinget M, Belcourt A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2005; 38: 415-9.
75. Guo SW, Magnuson VL, Schiller JJ, Wang X, Wu Y, Ghosh S. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes: a HuGE review of genetic association studies. *Am J Epidemiol.* 2006; 164: 711-24.
76. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med.* 2004; 229:1136-42.
77. Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, Gomes L, Bastos M, Barros L, et al. Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Hum Immunol.* 2008; 69: 134-8.
78. Zemunik T, Skrabic V, Boraska V, Diklic D, Terzic IM, Capkun V, et al. Fok I polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 600-4.



79. Mory D, Rocco E, Miranda W, Kasamatsu T, Crispim F, Dib SA. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to β -cell autoimmunity and to remaining β -cell function. *Hum Immunol*. 2009; 70: 447-51.
80. Boraska V, Skrabić V, Zeggini E, Groves CJ, Buljubasić M, Peruzović M, et al. Family-based analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes in the population of South Croatia. *J Hum Genet*. 2008; 53: 210-4.
81. Xiao XH, Liu ZL, Wang H, Sun Q, Li WH, Yang GH, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Chin Med Sci J*. 2006; 21: 95-8.
82. Garcia D, Angel B, Carrasco E, Albala C, Santos JL, Pérez-Bravo F. VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 77: 134-40.
83. Ramos-Lopez E, Regulla K, Pani MA, Krause M, Usadel KH, Badenhoop K. CYP27B1 polymorphisms variants are associated with type 1 diabetes mellitus in Germans. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90: 155-7.
84. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia*. 1997; 40: 971-5.
85. Ban Y, Taniyama M, Yanagawa T, Yamada S, Maruyama T, Kasuga A, et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Japanese population. *BMC Med Genet*. 2001; 2: 7.
86. Yokota I, Satomura S, Kitamura S, Taki Y, Naito E, Ito M, et al. Association between vitamin D receptor genotype and age of onset in juvenile Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25: 1244.
87. Skrabić V, Zemunik T, Situm M, Terzić J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003; 59: 31-5.
88. Fassbender WJ, Goertz B, Weismüller K, Steinhauer B, Stracke H, Auch D, et al. VDR gene polymorphisms are overrepresented in German patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. *Horm Metab Res*. 2002; 34: 330-7.



89. Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MC, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52: 575–80.
90. Koeleman BP, Valdigem G, Eerligh P, Giphart MJ, Roep BO. Seasonality of birth in patients with type 1 diabetes. *Lancet*. 2002; 359: 1246–7.
91. Audi L, Marti G, Esteban C, Oyarzabal M, Chueca M, Gussinyé M, et al. VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (Fok I) may have influenced type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. *Diabet Med*. 2004; 21: 393–4.
92. San-Pedro JI, Bilbao JR, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Martul P, Castaño L. Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*. 2005; 38: 439–44
93. Capoluongo E, Pitocco D, Concolino P, Santonocito C, Di Stasio E, d'Onofrio G, et al. Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. *Clin Biochem*. 2006; 39: 888-92.
94. Mimbacas A, Trujillo J, Javiel G, Cardoso H. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms in a Uruguayan population and its relation to type 1 diabetes. *Genet Mol Res*. 2007; 6: 534–42.
95. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SG, Brandão C, Ramalho AC, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 1998; 8: 204–10.
96. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000; 49: 504–7.
97. Guja C, Marshall S, Welsh K, Merriman M, Smith A, Todd JA, et al. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. *J Cell Mol Med*. 2002; 6: 75–81.
98. Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, Madácsy L, Tordai A, Tulassay T, et al. Gender specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2002; 147: 803–8.



99. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M, et al. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149: 591–6.
100. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3137–40.
101. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JM, Rance H, Nutland S, et al. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: 2709–12.
102. Angel B, Santos JL, Carrasco E, Albala C, Pérez-Bravo F. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in Chilean subjects: a case-parent study. *Eur J Epidemiol.* 2004; 19: 1085–7.
103. Bianco MG, Minicucci L, Calevo MG, Lorini R. Vitamin D receptor polymorphisms: are they really associated with type 1 diabetes? *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: 641–2.
104. López T, García D, Angel B, Carrasco E, Codner E, Ugarte F, et al. Association between Fok I vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and plasmatic concentrations of transforming growth factor-beta1 and interferon gamma in type 1 diabetes mellitus. *Med Clin (Barc).* 2008; 130: 81-4
105. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer H, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Rev.* 2008; 29: 726-76.
106. Ramos-Lopez E, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, et al. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: 193–7.
107. Pani MA, Regulla K, Segni M, Krause M, Hofmann S, Hufner M, et al. Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2002; 146: 777-81.
108. Bailey R, Cooper J, Zeitels L, Smyth D, Yang JH, Walker NM, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2007; 56: 2616-21.



109. Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Herwig J, Badenhop K. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007; 23: 631-6.
110. Ongagna JC, Kaltenbacher MC, Sapin R, Pinget M, Belcourt A. The HLA-DQB alleles and amino acid variants of the vitamin D binding protein in diabetic patients in Alsace. *Clin Biochem*. 2001; 34: 59–63.
111. Klupa T, Malecki M, Hanna L, Sieradzka J, Frey J, Warram JH, et al. Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. *Eur J Endocrinol*. 1999; 141: 490-3.
112. Pani MA, Donner H, Herwig J, Usadel KH, Badenhop K. Vitamin D binding protein alleles and susceptibility for type 1 diabetes in Germans. *Autoimmunity*. 1999; 31: 67–72.



6 – ANEXO – DECLARAÇÃO DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO